



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia da Teoria a Prática - LOT 2053

AULA 2- ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICRORGANISMOS

ROTEIRO 2: OBTENÇÃO DE CULTURA PURA

1- INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos eucariotos que habitam, em sua maioria, vegetais e seus derivados ricos em glicídios. Têm grande relevância industrial, sendo utilizadas na produção de biomassa com aplicações nos setores de alimentos e biocombustíveis.

Bactérias Gram-positivas, como os actinomicetos (ordem *Actinomycetales*) e espécies do gênero *Bacillus*, predominam na rizosfera, região do solo diretamente influenciada pelas raízes das plantas. Esses grupos bacterianos destacam-se pela capacidade de sintetizar uma ampla variedade de antibióticos, especialmente os actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Dentro desse grupo, o gênero *Frankia* merece destaque por sua habilidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio no interior das raízes de plantas lenhosas.

Entre as espécies do gênero *Bacillus*, ressalta-se *Bacillus thuringiensis*, produtora de um cristal proteico com ação bioinseticida. Essa característica tem sido explorada tanto no desenvolvimento de formulações biológicas quanto na modificação genética de plantas, conferindo resistência a pragas e permitindo o controle de larvas de insetos da ordem *Lepidoptera* em diferentes culturas agrícolas.

2- OBJETIVOS

Isolar culturas puras leveduras e bactérias a partir de amostras de habitats naturais de colonização como uva e solo.

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

3- MATERIAL E EQUIPAMENTO

Material

- | | |
|-----------------------------------|---|
| ➤ Alças de Drigalsky | ➤ Placas de petri com meio de cultura sólido para cada grupo de microrganismo |
| ➤ Alças de repicagem | |
| ➤ Pipetas | |
| ➤ Ponteiras de 10,0; 1,0 e 0,1 mL | ➤ Tubos com meio de cultura líquido e sólido inclinado |



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia da Teoria a Prática - LOT 2053

- Garrafa para Solução salina (Cloreto de Sódio 1%)
- Amostras de Solo e Uva
- Tubos de ensaio

Equipamento

- Estufa de Bacteriológica
- Shaker
- Fluxo Laminar

4- PROCEDIMENTO

4.1 ISOLAMENTO DA LEVEDURA A PARTIR DE AMOSTRAS DE UVA

1. Macerar a amostra de uva e filtrar utilizando gase
2. Coletar 10,0 mL do extrato de uva com ponteira estéril e adicionar na garrafa de diluição com 90 mL de solução salina estéril (Diluição 10^{-1});
3. Homogeneizar a amostra, agitando a garrafa a 30 °C por 30 minutos no *shaker* ou agitando manualmente aproximadamente 30X (Figura 1);
4. 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 e 2 mL de amostra;
5. Espalhar 0,1 mL da amostra das diluições, em placa de Petri contendo meio nutritivo agar Levedura, com alça de Drigalsky estéril (Figura 3);
6. Lacrar e identificar a placa;
7. Incubar as placas invertidas na estufa a 28 °C por 2 dias.
8. Após crescimento de colônias de leveduras **repicar** para o meio caldo nutirente em tubo de ensaio;
9. Incubar a 28 °C por 2 dias;

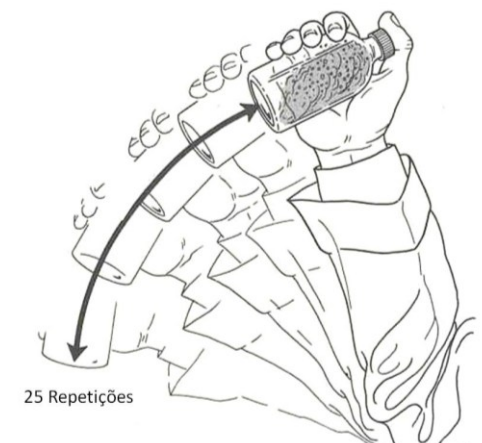


Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia da Teoria a Prática - LOT 2053

4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE AMOSTRAS DO SOLO

1. Cavar a terra numa região do rizosfera, a uma profundidade de 5 a 10 cm. Coletar uma amostra do solo.
2. No laboratório passar o solo na peneira e pesar 10,0 gramas.
3. Adicionar 10,0g do solo peneirado e adicionar na garrafa de diluição com 90 mL de solução salina estéril (Diluição 10^{-1});
4. Homogeneizar a amostra, agitando a garrafa a 30 °C por 30 minutos no *shaker* ou agitando manualmente aproximadamente 30X (Figura 1);
5. 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 e 2 mL de amostra;
6. Espalhar 0,1 mL da amostra das diluições, em placa de Petri contendo meio nutritivo agar Levedura, com alça de Drigalsky estéril (Figura 3);
7. Lacrar e identificar a placa;
8. Incubar as placas invertidas na estufa a 37 °C por 24 horas.
9. Após crescimento de colônias de leveduras **repicar** para o meio caldo nutrente em tubo de ensaio;
10. Incubar a 37 °C por 24 horas;

Figura 1: Mistura manual da amostra em solução

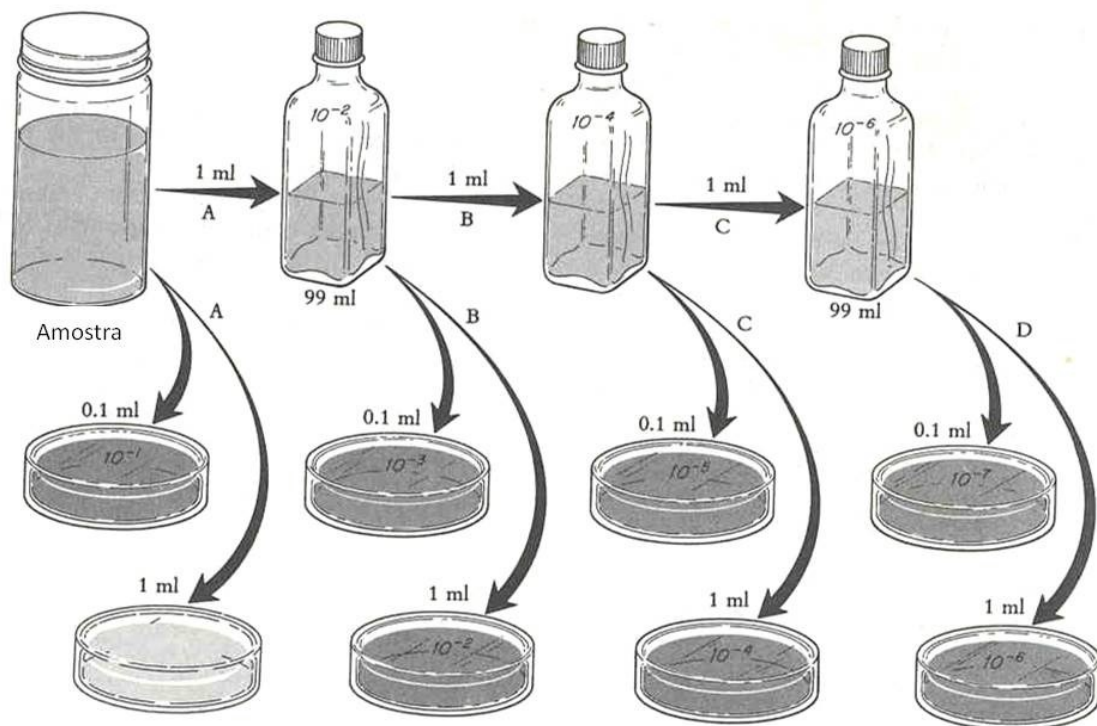




Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia da Teoria a Prática - LOT 2053

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

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



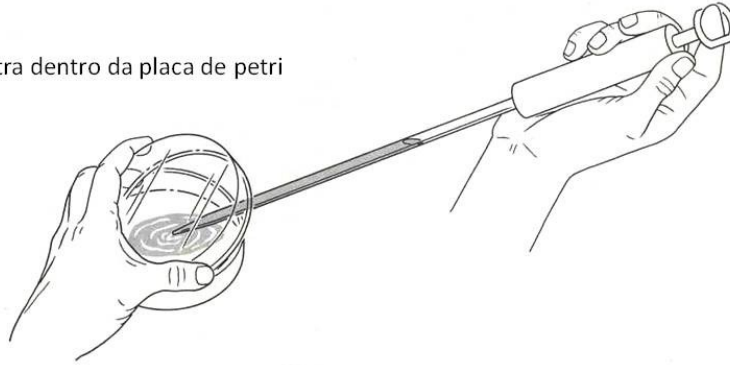
Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia da Teoria a Prática - LOT 2053

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: