

Unidade I

Métodos convencionais em microbiologia

Margarida Casal, Dorit Schuller, Georgina Rodrigues e Célia Pais

1. Considerações gerais sobre segurança no laboratório	2
2. Agentes de desinfecção e de esterilização	4
2.1. Agentes químicos	5
2.2. Agentes físicos	6
3. Preparação de culturas microbianas	9
3.1. Procedimentos assépticos	10
3.2. Preparação de meios de cultura	13
3.3. Preparação de culturas microbianas	17
4. Manutenção e utilização de culturas microbianas puras	21

Ao iniciar os seus estudos em microbiologia deverá ter presente um conjunto de regras e de conceitos muito elementares que o vão ajudar a realizar os trabalhos laboratoriais. Nesta primeira Unidade vamos apresentar de uma forma simplificada, algumas noções que se irão revelar de muita utilidade ao executar os trabalhos propostos ao longo deste Manual. Assim, e se esta é também a sua primeira experiência no laboratório, será conveniente que realize os trabalhos práticos que lhe propomos nesta Unidade.

1. Considerações gerais sobre segurança no laboratório

A segurança num laboratório de microbiologia envolve implementação de procedimentos particulares, associados às metodologias necessárias para manipular culturas microbianas. Por um lado, devido às reduzidas dimensões das células, que para nós são imperceptíveis, e por outro, pela necessidade de trabalhar com culturas celulares puras, as quais podem conter um número elevadíssimo de células microbianas, o laboratório deverá estar organizado de forma a garantir a boa execução dos trabalhos que lhe vamos propor. Em qualquer espaço laboratorial, os procedimentos a seguir devem incluir o cumprimento de regras de funcionamento, de medidas de segurança obrigatórias e o manuseamento correcto e cuidadoso do material, dos reagentes químicos e do equipamento laboratorial. Atender a estes princípios contribui para a prevenção de acidentes e para impedir a existência de fontes de contágio ou de perigo no local de trabalho.

Descrevem-se, seguidamente, um conjunto de regras básicas cujo cumprimento deve ser obrigatório num laboratório de microbiologia.

- ✓ Utilizar sempre uma bata limpa
- ✓ Limpar a bancada de trabalho convenientemente com álcool etílico a 70% (v/v) e manter o material em ordem
- ✓ Lavar as mãos no início e no final de cada sessão de trabalho experimental
- ✓ Manter os bicos de Bunsen e as lamparinas acesas apenas enquanto são necessários
- ✓ Não comer, beber ou fumar no laboratório
- ✓ Identificar todo o material utilizando para isso marcadores de vidro apropriados

- ✓ No manuseamento de compostos químicos considerados perigosos, evitar o contacto cutâneo ou a sua inalação, recorrendo ao uso de uma hote, de luvas, máscara ou óculos de protecção, consoante as características dos compostos
- ✓ Não pipetar com a boca
- ✓ Estabelecer regras bem definidas para o circuito do material de vidro e de plástico no laboratório, assim como para a sua lavagem
- ✓ Manusear com muita precaução certos materiais e aparelhos frágeis e/ou muito sensíveis e mantê-los devidamente limpos. É o caso dos termómetros, cabeças de aquecimento termostalizadas, aparelhos de medição de pH e balanças, entre outros
- ✓ Nunca usar aparelhos sem conhecer em pormenor o procedimento de utilização
- ✓ Colocar as pipetas de vidro sujas em contentores de plástico com uma solução com detergente e devidamente identificados para esse fim
- ✓ Colocar as pontas sujas das pipetas automáticas num recipiente devidamente identificado para esse fim
- ✓ Antes de colocar na pia de lavagem do laboratório material de vidro sujo contendo soluções/suspensões, deixar informação sobre os riscos do seu conteúdo, de modo a ficar claro o destino que se lhe deve dar
- ✓ Colocar todo o material de vidro/plástico contendo suspensões de microrganismos, no local indicado para posterior autoclavagem
- ✓ Colocar num local bem visível e acessível: os chuveiros (utilizados para uma primeira e rápida descontaminação), os extintores e o número do telefone de emergência (112) ou a extensão do guarda de segurança
- ✓ Antes de se abandonar o laboratório, verificar se todas as janelas se encontram devidamente fechadas e se todos os aparelhos (placas de aquecimento, bicos de Bunsen, lamparinas, autoclaves, microscópios) se encontram desligados

2. Agentes de desinfecção e de esterilização

No sentido de impedir a contaminação das culturas microbianas com que se pretendem desenvolver os trabalhos práticos de microbiologia, deve proceder-se à desinfecção e esterilização dos objectos necessários e do ambiente.

A desinfecção de um determinado objecto ou ambiente, consiste na destruição, inibição ou remoção de agentes microbianos causadores de doenças ou de outros problemas, como por exemplo a degradação de alimentos, com recurso a agentes físicos ou a agentes químicos. Neste processo são eliminadas as células vegetativas, mas não se promove a destruição de esporos. Muitos dos produtos de limpeza doméstica tais como a amónia e a lixívia, são desinfectantes. Os desinfectantes domésticos, na sua grande maioria, são fortes agentes oxidantes. Os sabões, sais biliares e fenóis, actuam por alteração da tensão superficial na interface célula/meio. O óxido de etileno, o glutaraldeído ou o formaldeído são os agentes químicos de maior utilização a nível industrial. Outros agentes como os álcoois promovem a desnaturação de proteínas e a solubilização de lípidos.

Duas regras importantes na utilização de desinfectantes são:

1. Usar sempre a forma mais concentrada que cause o mínimo prejuízo ao tecido ou superfície inerte a desinfectar;
2. Caso seja necessária a utilização prolongada do produto, deve aplicar-se uma combinação de agentes ou intercalar com outros agentes eficazes.

A esterilização de um determinado objecto ou ambiente, significa a destruição completa de toda e qualquer célula viva em crescimento activo, numa forma vegetativa ou em latência, incluindo os esporos. Os processos usados envolvem o recurso a agentes físicos e químicos, como adiante se descreve.

2.1. Agentes químicos

- Hipoclorito de sódio

Trata-se de um composto muito apropriado para a desinfecção de superfícies e de ambientes. A concentração mais comum para essa finalidade é a de 1% (p/v). Revela-se corrosivo para alguns metais e o contacto não deve exceder 30 minutos. Após esse período deve proceder-se à lavagem e secagem das superfícies ou ambientes desinfectados.

- Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são muito eficazes na remoção completa de restos orgânicos. O *triclosan* é dotado de actividade bactericida de amplo espectro, com excepção para a *Pseudomonas aeruginosa*.

- Iodo

O iodo é um dos desinfectantes mais antigos para aplicação na pele e mucosas. Actualmente, devido à sua acção germicida e menor efeito cáustico, são aconselhados os compostos libertadores de iodo (iodóforos).

- Glutaraldeídos

Os glutaraldeídos são compostos que apresentam actividade máxima a diferentes valores de pH. Conseguem ser efectivos contra todos os microrganismos incluindo mesmo o bacilo da tuberculose. Embora sejam excelentes desinfectantes e esterilizantes, não funcionam como anti-sépticos. Na medida em que provocam irritações na pele, o contacto directo não deve ocorrer.

- Álcoois

Os álcoois etílico e isopropílico são normalmente utilizados para desinfecção de superfícies e anti-sepsia da pele. São compostos bactericidas de baixa potência e, embora possam destruir o bacilo da tuberculose e o vírus do herpes simples, não actuam contra vírus do tipo hidrófilo, como o da hepatite B. Não podem ser considerados como

agentes de limpeza efectivos. Quando deixados por períodos prolongados em contacto com a pele, tornam-se irritantes.

2.2. Agentes físicos

Os agentes físicos mais utilizados na esterilização e desinfecção de ambientes ou objectos são: o calor húmido, o calor seco, a filtração e as radiações (Tabela 1.1). Estas são sobretudo muito úteis para esterilização de espaços, salas, instrumentos e materiais que não suportam as temperaturas exigidas pelas técnicas do calor.

- Calor húmido

A esterilização por calor húmido pode ser conseguida através da fervura, autoclavagem ou pasteurização. O calor húmido conduz à destruição rápida de organismos por coagulação das proteínas constituintes das suas células. O aparelho mais utilizado na esterilização de materiais e meios de cultura é o autoclave. Geralmente os autoclaves de laboratório funcionam sob a pressão de 1 atm e à temperatura de 121°C. A duração do tempo de esterilização está relacionada não só com a temperatura, como também com a relação superfície/volume da massa do material a esterilizar, ou seja, com o tempo de penetração do calor. Para a mesma temperatura, os tempos de tratamento térmico são tanto maiores quanto maior for o volume do material a esterilizar. De uma forma geral, os materiais ficam esterilizados em 20-40 minutos. O material a esterilizar deve ser devidamente preparado. Assim, os frascos a esterilizar devem ser tapados com rolhas de algodão. Se apresentam tampas com rosca, estas devem ser pouco apertadas para que haja saída de ar quente e entrada de vapor, de modo a evitar o seu rebentamento no autoclave.

- Calor seco

A esterilização pelo calor seco pode ser alcançada pelos seguintes métodos: flamejção, incineração ou estufa de ar quente. As estufas de ar quente atingem temperaturas da ordem de 160-180°C, que provocam a oxidação e a desnaturação das proteínas destruindo quer as células vegetativas, quer os esporos. Contudo deve ter-se

em atenção que o uso de temperaturas muito elevadas e um tempo de exposição muito prolongado podem interferir na estabilidade de alguns materiais, de que o aço é exemplo, ou mesmo causar a sua deterioração, como é o caso de materiais como a borracha e os tecidos. Como o poder de penetração do calor seco é baixo, este método só deve ser utilizado quando o contacto com o vapor é inadequado, nomeadamente com materiais de vidro, outros materiais sólidos termoestáveis ou alguns componentes do laboratório.

- Filtração

É o método mais usado quando se pretendem esterilizar soluções contendo compostos químicos termo-sensíveis como, por exemplo, vitaminas ou antibióticos. Neste caso, procede-se em primeiro lugar à preparação de soluções stock que são esterilizadas por filtração. Em seguida deixa-se arrefecer o meio de cultura para valores de temperatura inferiores a 50°C e adicionam-se então as soluções de vitaminas ou antibióticos previamente esterilizadas.

Actualmente, os filtros encontrados no mercado são de acetato de celulose ou policarbonato e permitem filtrações com elevado grau de precisão. Existem filtros com dimensão de diâmetro de poro variável, no entanto, os mais utilizados para efeitos de esterilização têm poros de 0,45 ou de 0,2 µm, os quais retêm, respectivamente, as células e vírus presentes nas soluções.

Para esterilizar uma solução por filtração, deve passar-se a solução através de um filtro, como por exemplo um filtro de seringa, e o filtrado tem que ser recolhido em condições de assépsia para que não ocorra contaminação do líquido esterilizado.

A esterilização de ar também pode ser conseguida por filtração. Uma câmara de fluxo laminar possui um sistema de filtração de ar por membrana. Esse ar filtrado é pressionado para o interior da câmara em feixes paralelos, obrigando o ar do interior a sair pelos poros da caixa inferior (câmara de fluxo vertical) ou pela abertura anterior (câmara de fluxo horizontal). Fica assim criado no interior da câmara, um ambiente estéril.

Tabela 1.1 - Controlo dos microrganismos por métodos físicos.

Método	Mecanismo de acção	Uso preferencial	Comentários
Calor húmido			
Fervura	Desnaturação de proteínas	Método de uso comum	Destrói bactérias, muitos vírus, fungos e esporos; alguns esporos bacterianos e vários vírus não são destruídos
Autoclave	Desnaturação de proteínas	Meios de cultura, soluções, materiais e instrumentos resistentes a temperatura e pressão elevadas	Método eficaz de esterilização
Pasteurização	Desnaturação de proteínas	Indústria alimentar, na produção de produtos lácteos, bebidas e conservas	Destrói bactérias; dependendo da temperatura e do tempo de exposição pode esterilizar
Calor seco			
Flamejação		Ansa, espalhador, agulha de platina	Método eficaz de esterilização
Incineração	Redução a cinzas de todo o material, por oxidação	Papéis, carcaças de animais, restos de curativos (algodão, gaze)	Método eficaz de esterilização
Estufa	Oxidação de todo o material	Materiais de vidro e outros materiais resistentes a altas temperaturas	Método eficaz de esterilização
Filtração	Remoção mecânica de microrganismos	Usada na eliminação de microrganismos de líquidos termos-sensíveis e do ar	Remoção de bactérias e fungos (pode não remover alguns vírus)
Radiações			
Ionizantes (raios gama)	Destruição de DNA, formação de radicais livres	Material sensível ao calor (plásticos)	Método eficaz de esterilização
Não-ionizantes (UV)	Mutação do DNA, formação de dímeros	Centros cirúrgicos, laboratórios	Uso restrito; controlo dos microrganismos do ar

- Radiações

As radiações são muito úteis para a esterilização de espaços, de salas, de instrumentos e de materiais que não suportam as temperaturas exigidas pelas técnicas do calor.

A esterilização por radiação ionizante é uma técnica altamente eficiente, económica e segura. As radiações de alta energia são utilizadas na esterilização de materiais cuja sensibilidade ao calor exige condições particulares de tratamento.

A radiação ionizante promove a quebra das cadeias moleculares e induz reacções dos fragmentos com o oxigénio atmosférico ou com compostos oxigenados, originando a morte das células. As radiações utilizadas incluem os raios gama, produzidos a partir de cobalto-60 ou césio-139, e de raios catódicos produzidos em geradores e aceleradores de electrões. Os raios gama são radiações com poder ionizante que promovem a alteração de compostos celulares. Estes raios têm elevado poder de penetração sendo ideais para aplicação em objectos volumosos. Problemas técnicos dificultam ainda a sua aplicação corrente em microbiologia.

A irradiação com luz ultravioleta (UV) é uma forma pouco satisfatória de esterilização devido à fraca capacidade de penetração nos materiais e produtos a esterilizar. A energia das radiações é absorvida por moléculas como o DNA, conduzindo a alterações da estrutura molecular que poderão ser letais para os microrganismos. Os raios UV são frequentemente utilizados na diminuição do nível de contaminação de espaços pequenos. Deve ter-se sempre presente que a lâmpada UV só deve estar ligada na ausência de pessoas no laboratório.

3. Preparação de culturas microbianas

A preparação de culturas microbianas, e em particular a inoculação da estirpe ou estirpes microbianas que pretendemos fazer crescer, envolvem uma série de procedimentos assépticos que deverão ocorrer em condições apropriadas. Estas questões vão ser de seguida abordadas.

3.1. Procedimentos assépticos

Há certas precauções que devem ser tomadas durante a inoculação de uma cultura microbiana de modo a evitar a contaminação das culturas, das pessoas ou do ambiente:

- ✓ Certificar-se de que ao dar início às operações, todo o material necessário está ao alcance imediato, de forma a realizar o trabalho o mais rapidamente possível
- ✓ Desinfectar e arrumar convenientemente a bancada de trabalho
- ✓ Os recipientes devem estar abertos o mínimo tempo possível e, enquanto abertos, todo o trabalho deve ser realizado junto à chama do bico de Bunsen
- ✓ Uma vez abertos os recipientes, como tubos, balões e frascos, o seu bocal deve ser flamejado de imediato
- ✓ A fim de evitar as contaminações durante as manipulações que envolvam caixas de Petri, a exposição das superfícies internas estéreis deve durar o mínimo de tempo possível
- ✓ A extremidade das pipetas estéreis que vai ser colocada em contacto com as culturas celulares, ou com os recipientes estéreis, não deve ser tocada nem entrar em contacto com superfícies não estéreis, como é o caso da roupa, superfície da área de trabalho, o exterior de tubos, de balões ou quaisquer outros materiais

A utilização das ansas, pipetas e espalhadores, assim como a manipulação de frascos, balões e tubos de ensaio, em condições de assepsia, envolve alguns cuidados particulares.

- Ansas

As ansas são esterilizadas pela passagem na chama do bico de Bunsen, antes e depois de serem utilizadas (Figura 1.1). Devem ser aquecidas até ficarem ao rubro para assegurar que todos os esporos sejam destruídos. Devem ser agarradas quase pelo topo num ângulo praticamente vertical. O dedo mindinho deve ficar livre para segurar a tampa do recipiente.

- Pipetas

Para transferir culturas, meios e soluções estéreis devem utilizar-se pipetas graduadas ou pipetas de Pasteur estéreis de acordo com as normas a seguir descritas.

1. Remover a pipeta de vidro do pacote pela extremidade que contém o tampão de algodão, tendo o cuidado para não tocar mais do que o necessário de modo a segurar firmemente.
2. Colocar a pipete.
3. Segurar a pipeta como uma caneta mas não apertar a pipete. O dedo mindinho deve ficar livre para segurar na rolha de algodão/ tampa do tubo/ frasco.
4. Apertar a pipete com cuidado e retirar a quantidade de fluido necessária mas que não atinja nem molhe o tampão de algodão.
5. Colocar a pipeta usada num contentor de plástico com desinfetante, devidamente identificado para esse fim.
6. A pipete não deve ser retirada até a pipeta estar dentro do contentor de plástico, de modo a evitar que gotas de cultura contaminem a superfície de trabalho.

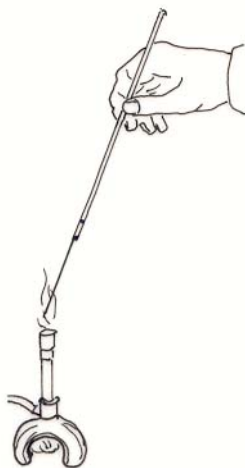


Figura 1.1 - Esterilização de uma ansa por flamação à chama do bico de Bunsen.

- Frascos, balões e tubos de ensaio

Quando se pretendem manipular frascos, balões ou tubos de ensaio em condições assépticas, deve proceder-se do seguinte modo (Figura 1.2):

1. Desapertar a tampa dos frascos/balões ou tubos de ensaio de modo a poder ser retirada facilmente.
2. Segurar o frasco/ tubo com a mão esquerda.
3. Retirar a tampa/ rolha de algodão com o dedo mindinho da mão direita.
4. Não pousar a tampa/ rolha de algodão.
5. Flamejar o gargalo do frasco/ tubo fazendo-o passar pela chama do bico de Bunsen.
6. Recolocar a tampa do recipiente.

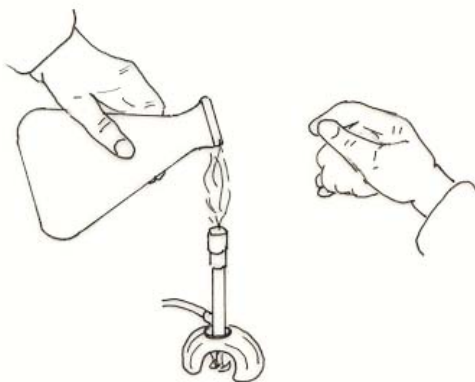


Figura 1.2 - Flamejação do gargalo de um frasco.

- Espalhadores

Os espalhadores são usados para distribuir inóculos sobre a superfície de placas já preparadas com meios de cultura (Figura 1.3). Podem ser esterilizados em estufa uma vez empacotados, ou por flamação com álcool.

- Esterilização com álcool

A esterilização de espalhadores com álcool envolve os procedimentos que se encontram ilustrados na Figura 1.4, nomeadamente:

1. Mergulhar a extremidade do espalhador num pequeno volume de álcool a 70% (v/v) contido num recipiente com tampa ou coberto com papel de alumínio.
2. Passar rapidamente através da chama do bico de Bunsen; o álcool vai arder esterilizando o vidro.
3. Afastar o espalhador ligeiramente da chama até o álcool parar de arder.
4. Pousar o espalhador numa superfície estéril como uma caixa de Petri ou um copo graduado.

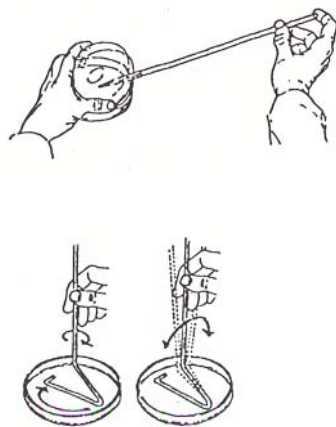


Figura 1.3 - Espalhamento de uma suspensão de microrganismos à superfície do meio sólido na placa de Petri.

O espalhamento deve ser feito mantendo o espalhador de vidro na posição vertical.

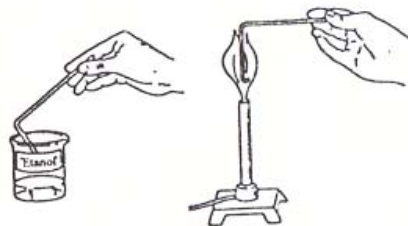


Figura 1.4 - Esterilização de espalhadores com álcool.

3.2. Preparação de meios de cultura

A possibilidade de cultivar um determinado microrganismo em laboratório é essencial para o seu isolamento e caracterização do ponto de vista morfológico, fisiológico, bioquímico ou genético. Deve ter-se em consideração que, dependendo das

condições de cultura, o microrganismo em estudo vai revelar diferentes características. Assim, a cultura de um microrganismo em laboratório constitui o primeiro passo que vai conduzir ao seu estudo. É também a partir desta cultura que este pode ser classificado e se pode proceder à identificação da espécie a que pertence. Só assim se podem encontrar novas espécies, e/ou mesmo encontrar novas associações taxonómicas.

Os meios de cultura que se utilizam em laboratório e em condições controladas, podem ser sólidos ou líquidos. A sua preparação é um processo simples mas requer a aplicação de certas regras:

- ✓ O material de vidro utilizado deve estar bem lavado para evitar a contaminação com detergentes ou outros químicos
- ✓ As espátulas utilizadas na pesagem de componentes devem estar limpas
- ✓ A água deve ser colocada previamente no recipiente e só depois se devem adicionar os componentes para dissolução. Uma adição da água posterior à colocação dos componentes pode originar a formação de agregados que se colam ao fundo do frasco dificultando a sua dissolução
- ✓ Se o meio contém muitos componentes, estes devem ser dissolvidos individualmente antes de efectuar a mistura. O agar só deve ser adicionado à mistura após os outros componentes terem sido dissolvidos
- ✓ Os meios só devem ser preparados no momento em que vão ser esterilizados
- ✓ Os frascos com meio de cultura para autoclavar não devem exceder a metade da sua capacidade. As rolhas/ tampas devem estar pouco apertadas durante a autoclavagem

A sementeira de amostras recolhidas em ambientes naturais contém em regra, populações mistas de microrganismos, pelo que devem utilizar-se meios de cultura complexos que permitam o crescimento do maior número possível de isolados. Contudo, mesmo nestas circunstâncias não é possível detectar-se mais do que uma pequena percentagem dos indivíduos presentes na população inicial. Uma vez isolado um determinado microrganismo, torna-se necessária a sua caracterização. Em estudos de nutrição, inibição, toxicidade ou outros, são utilizados de meios de composição definida.

Os meios de cultura sólidos são usados para contagem de colónias de microrganismos e para a multiplicação, isolamento e conservação dos microrganismos isolados. O isolamento de determinados microrganismos é conseguido com maior rapidez e eficácia se for realizado em meios de cultura selectivos/diferenciais. Os meios

de cultura líquidos possibilitam o desenvolvimento de espécies contidas em populações mistas e permitem a realização de estudos de crescimento e nutrição.

- Meio YEPD

O meio YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) é o meio rico mais utilizado para o crescimento de fungos e em particular de leveduras, sempre que não são necessárias condições especiais para o seu cultivo. Fornece um excesso de carbono e azoto, assim como de aminoácidos, precursores de nucleótidos, vitaminas e metabolitos essenciais para um óptimo crescimento celular.

*Composição do meio YEPD**

Extracto de levedura	5 g/l
Peptona	10 g/l
Glucose	20 g/l
Agar	20 g/l (para meios de cultura sólidos)

*Pode usar-se a mesma receita reduzindo as concentrações para metade, excepto o agar. O agar apenas é adicionado na preparação de meios de cultura sólidos.

Preparação de meio YEPD

1. Medir o volume necessário de água desionizada para um balão Erlenmeyer.
2. Pesar o extracto de levedura, a peptona e a glucose.
3. Adicionar ao balão e agitar até dissolver.
4. Adicionar o agar e agitar até homogeneizar.
5. Perfazer o volume final desejado, adicionando água e agitar.
6. Esterilizar o meio de cultura no autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

A solução de glucose também pode ser esterilizada por filtração (filtros estéreis de poro 0,45 µm) em condições assépticas. Posteriormente, também em condições assépticas, a solução de glucose pode ser adicionada à outra solução já esterilizada. Por fim, o meio é vertido em placas esterilizadas e deixado solidificar.

- Meio LB

O meio LB (Luria-Bertani broth) é utilizado para crescimento e manutenção de bactérias.

Composição do meio LB

Triptona	10 g/l
Extracto de levedura	5 g/l
Cloreto de sódio	10 g/l
Agar	20 g/l (para meios de cultura sólidos)

Preparação de meio LB

1. Medir o volume necessário de água desionizada para um balão Erlenmeyer.
2. Pesar o extracto de levedura, a triptona e o cloreto de sódio.
3. Adicionar ao balão e agitar até dissolver.
4. Adicionar o agar e agitar até homogeneizar.
5. Perfazer o volume final desejado, adicionando água e agitar.
6. Esterilizar o meio de cultura no autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Verter meios em placas de Petri

1. Retirar o frasco de meio com agar derretido do autoclave e deixar arrefecer até aos 50 °C, de preferência num banho-maria.
2. Segurar o frasco com a mão esquerda junto à chama do bico de Bunsen e retirar a rolha com a mão direita.
3. Passar o gargalo pela chama.
4. Retirar ligeiramente a tampa da caixa de Petri com a mão direita, verter o meio estéril na caixa e recolocar a tampa (normalmente colocam-se 15-20 ml de meio por caixa de Petri); a base da caixa deve ficar coberta, o agar não deve tocar na tampa da caixa e a superfície deve ficar sem bolhas.
5. Passar o gargalo pela chama e recolocar a rolha.

6. Agitar suavemente a caixa para assegurar que o meio fica uniformemente distribuído.
7. Deixar o meio solidificar na placa.
8. Guardar a placa em posição invertida.

3.3. Preparação de culturas microbianas

Uma vez que as leveduras, em particular *Saccharomyces cerevisiae*, se encontram entre os organismos eucariontes cuja biologia celular tem sido melhor estudada, este grupo de microrganismos foi seleccionado para exemplificar os procedimentos que se seguem. Esta escolha prende-se também com a sua importância industrial, pois como é do conhecimento geral as leveduras têm um papel fundamental em processos de grande importância económica, como são o fabrico do vinho e da cerveja e a produção de levedura para panificação. Por outro lado, a simplicidade da sua organização celular e o seu rápido crescimento em condições controladas de laboratório, fazem das leveduras e em particular a espécie *S. cerevisiae*, modelos experimentais particularmente eficazes.

	<i>Preparação de uma cultura em estria de leveduras em meio sólido</i>
--	--

1. Marcar a parte marginal da base de uma placa de Petri com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, data, identificação do grupo de trabalho.
2. Esterilizar uma ansa à chama e retirar uma ansada da cultura a isolar, fazendo deslizar a ansa sem danificar a superfície do agar.
3. Espalhar a porção de cultura, riscando a superfície da placa e seguindo as setas como se indica na Figura 1.5; entre cada novo riscado, passar a ansa na chama, realizar esta operação fazendo deslizar a ansa sem danificar a superfície do agar.
4. Em vez de usar um ansa pode ser utilizado um palito autoclavado, neste caso utilizar um palito novo por cada série de riscas.
5. Incubar as placas em posição invertida, durante 2 a 3 dias à temperatura ambiente. Observar as placas e registar a existência de colónias isoladas.

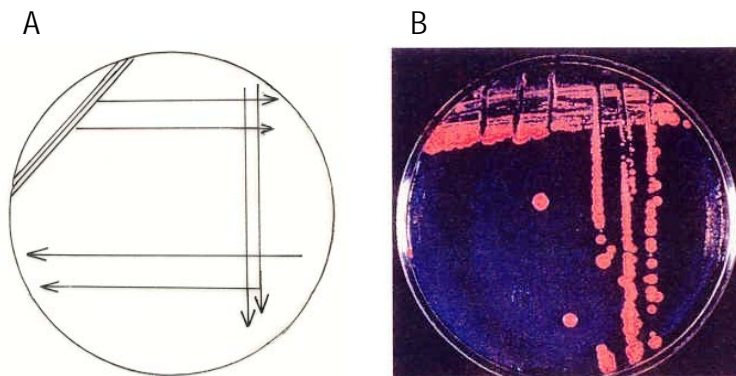


Figura 1.5 – Isolamento de microrganismos pela técnica de cultura em estria. A) Diagrama de uma placa de isolamento. B) Aspecto de uma placa de Petri com colónias isoladas.

Inoculação de uma cultura de leveduras por espalhamento em meio sólido

Antes de proceder à sementeira das placas, estas devem ser convenientemente marcadas na parte marginal do fundo de modo a conter os seguintes dados: número do grupo de trabalho, microrganismo, diluição da suspensão e data do ensaio. A sementeira pode ser feita em meio YEPD.

Preparação de uma série de diluições decimais de uma cultura de leveduras

1. Preparar tubos de ensaio contendo 9 ml de água desionizada.
2. Esterilizar em autoclave durante 20 minutos a 120°C e a 1 atmosfera.
3. Preparar uma suspensão densa da levedura *S. cerevisiae* num tubo contendo água estéril (Figura 1.6).
4. Agitar o tubo de ensaio no vortex (cerca de 5 segundos).
5. Com uma pipeta estéril de 1 ml ou usando uma pipeta automática com pontas estéreis, retirar assepticamente 1 ml da suspensão microbiana.
6. Introduzir o volume de 1ml da suspensão no primeiro tubo de diluição (10^{-1}).
7. Homogeneizar a suspensão por agitação no vortex.
8. Com uma nova pipeta estéril retirar 1 ml da diluição 10^{-1} e transferir para outro tubo para obter a diluição 10^{-2} .

9. Continuar este procedimento até obter a diluição 10^{-6} .

	<i>Inoculação de uma cultura de leveduras por espalhamento em meio sólido</i>
--	---

1. Antes de proceder à sementeira das placas de Petri, estas devem ser marcadas na parte marginal da sua base com as seguintes indicações: meio de cultura, organismo, diluição, data do ensaio, identificação do grupo de trabalho.
2. Seleccionar as três últimas diluições da suspensão de *S. cerevisiae* 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .
3. Agitar vigorosamente cada um dos tubos de ensaio contendo a diluição antes de proceder à sua inoculação em meio sólido.
4. Entreatrir três caixas de Petri com meio YEPD e colocar 0,1 ml de cada uma das três diluições (Figura 1.6).
5. Mergulhar o espalhador no copo contendo álcool puro e passá-lo na chama do bico de Bunsen ou da lamparina. Deixar a chama apagar no espalhador e esperar cerca de 30 segundos até ele arrefecer.
6. Passar o espalhador sobre a superfície do meio rodando as caixas de Petri com cuidado. Após algum tempo nota-se uma certa resistência na movimentação do espalhador, o que indica que o inóculo foi absorvido pelo meio.
7. Todas as placas de Petri inoculadas devem ser incubadas à temperatura ambiente, durante 24 a 48 horas. Verificar se todas as placas estão devidamente identificadas antes de se colocarem na estufa (25 a 30 °C).

As diluições decimais realizadas a partir de suspensões densas de leveduras, se forem adequadas, permitem-nos obter, em placas com YEPD, colónias perfeitamente isoladas o que possibilita a sua contagem com maior rigor. É fundamental que o número de colónias desenvolvidas nas placas não seja demasiado grande porque algumas células poderão não formar colónias e a contagem não será correcta. Também não deve ser demasiado pequeno de modo a inviabilizar o significado estatístico da contagem. A prática usual mais válida, consiste em contar colónias apenas nas placas que tenham entre 20 e 200 colónias.

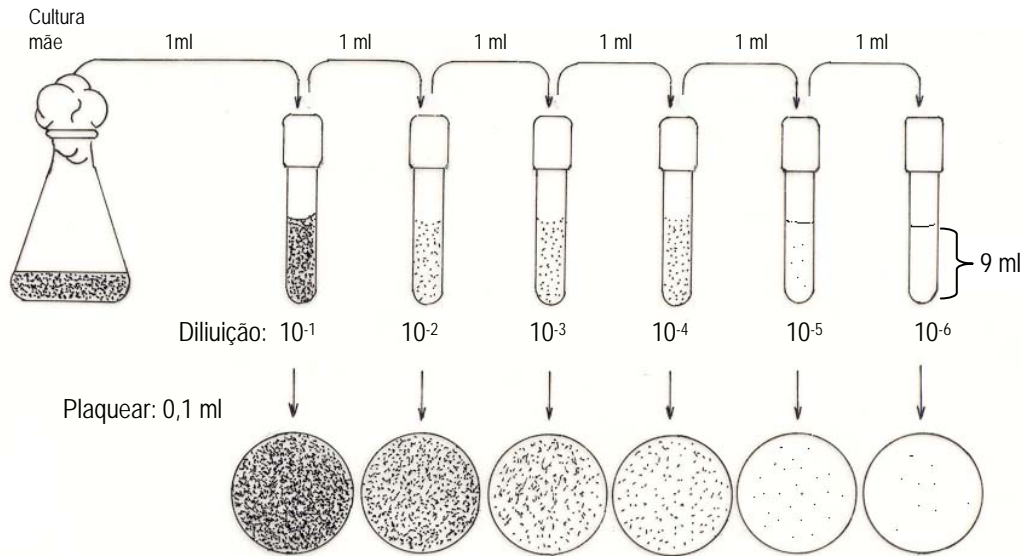


Figura 1.6 - Diluições decimais de uma cultura microbiana e inoculação por espalhamento em meio de cultura sólido.

Inoculação de uma cultura de leveduras em meio de cultura líquido

1. Utilizando uma proveta estéril, verter para um balão Erlenmeyer de 250 ml estéril, 100 ml de meio YEPD.
2. Com a ajuda de uma ansa estéril, adicionar em condições de assépsia, o microrganismo proveniente de uma placa de isolamento previamente preparada (Figura 1.7).
3. Tapar o balão e coloca-lo no agitador orbital durante 24 horas, à temperatura de 25 a 30 °C.
4. Observar e registrar as alterações de turbidez da cultura ao longo do tempo.

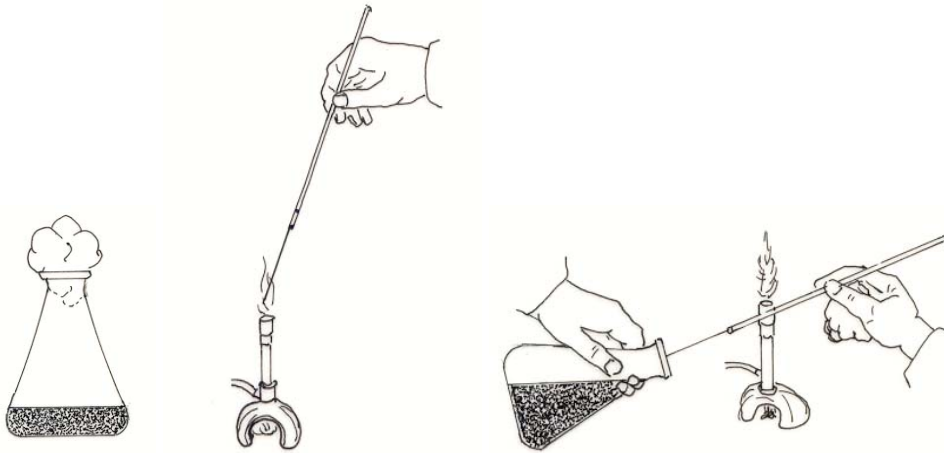


Figura 1.7 - Inoculação de uma cultura microbiana em meio de cultura líquido.

4. Manutenção e utilização de culturas microbianas puras

- Obtenção de culturas puras

A capacidade de manter no laboratório culturas puras, é fundamental para uma boa prática microbiológica. A concretização eficaz deste método é crucial por razões de segurança e manutenção da qualidade dos trabalhos a desenvolver.

Quando uma cultura aparecer contaminada, não é aconselhável tentar remediar a situação tirando um inóculo de uma única colônia da placa da cultura misturada, pois há a possibilidade de não se ser capaz de distinguir a cultura contaminada da cultura original. Deve recorrer-se à coleção de culturas do laboratório, tendo o cuidado de manter o stock em condições de assépsia.

- Manutenção de culturas

É conveniente manter uma cultura pura em stock. A maioria das culturas que são consideradas apropriadas para uso, são também facilmente mantidas por sub-cultivo em meio de cultura para crescimento. Para evitar os sub-cultivos, as culturas devem ser mantidas em criotubos contendo meio líquido ao qual se adiciona glicerol (30%, p/v, concentração final), e congeladas a -70°C (Figura 1.8). Na ausência deste equipamento, podem manter-se a -20°C . O laboratório deve organizar a sua coleção de

microrganismos, elaborando para isso um registo de cada uma das espécies, o meio de cultura apropriado, bem como da sua origem.

Para retirar um novo inóculo basta remover um pouco da cultura (por exemplo com um palito estéril), e inocular pelo método do riscado numa placa de Petri com o meio de cultura adequado.

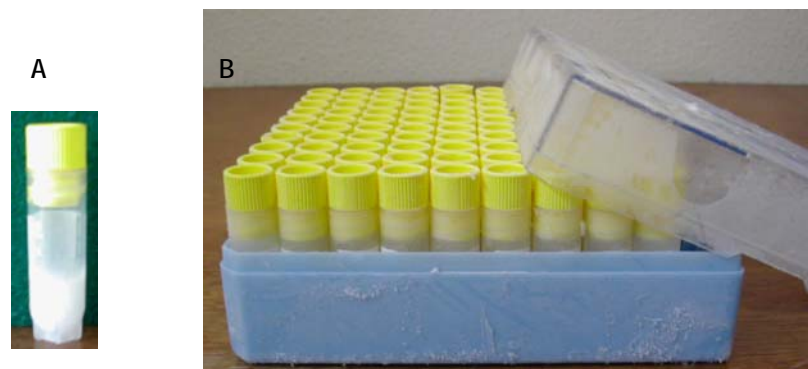


Figura 1.8 – Manutenção de culturas microbianas. A) Criotubo utilizado na manutenção de culturas microbianas a temperaturas baixas. B) Caixa de criotubos.

	<i>Bibliografia</i>
--	---------------------

Alcântara, F.; Cunha, M.A.; Almeida, M.A. (2ª edição). *Microbiologia: Práticas Laboratoriais*. Edições Universidade de Aveiro, Portugal.

Lopes, A. M. e Fonseca, A. (1996) *Biologia Microbiana*. Universidade Aberta; Portugal.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. e Parker, J. (10ª edição). *Brock - Biology of Microorganisms*. Prentice Hall international, New Jersey.

	<i>WWW</i>
--	------------

➤ <http://www.asmtusa.org/edusrc/labcore.htm>