ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICRORGANISMOS

ALGUMAS REGRAS GERAIS PARA A APLICAÇÃO DE ABORDAGENS ECOLÓGICAS PARA O ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Obs: Podem ser aplicadas no isolamento de qualquer grupo de microrganismo.

1. Listar os grupos de microrganismos que serão isolados.
2. Descrever as características do ambiente ou habitat do qual as amostras serão coletadas.
3. Agrupar as amostrar em tipos, por exemplo, partes vegetais, solo (tipos e horizontes), água, insetos...
4. Listar os parâmetros ambientais a serem considerados e medidos, tais como: pH, salinidade e temperatura.
5. Listar os substratos naturais disponíveis no ecossistema ex: Folhas (celulose, lignina), insetos (quitina)...
6. Escolher as técnicas de isolamento, isto é: diluentes, substratos, extratos naturais e condições de incubação.
7. Avaliar os “métodos de isolamento” ecológicos, usando método padrão como controle.
8. Modificar os procedimentos conhecidos com base nos parâmetros ecológicos do material a ser analisado.
9. Empregar procedimentos de enriquecimento específicos para grupos microbianos que possam ser de interesse na seleção.

TIPOS DE CULTURA:

1. Cultura Mista: mais de um microorganismo crescendo (natureza).

2. Cultura Pura: aquela que se origina do crescimento de uma única célula (pureza genética).

3. Cultura Axênica: constituída por uma única espécie de microrganismo, independente do número de indivíduos, num ambiente livre de outros microrganismos (não implica em pureza genética)

CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DE ACORDO COM SUA DIVERSIDADE METABÓLICA

Os microrganismos necessitam de uma fonte de carbono (gás carbônico (CO_2) ou carbono orgânico) e de uma fonte de energia (luz ou energia derivada da oxidação de compostos orgânicos ou inorgânicos). Os microrganismos que usam a luz como fonte de energia podem ser:

Fotoautotróficos ou fotolitotróficos: são organismos que usam a luz como fonte de energia e o carbono inorgânico (CO_2) como fonte de carbono. São representados pelas bactérias fotossintetizantes (cianobactérias), bactérias sulfurosas púrpura (exemplo: *Chromatium*) e bactérias sulfurosas verdes (exemplo: *Chlorobium*), algas e plantas verdes. Existem cerca de 60 espécies de bactérias fotoautotróficas.

Fotoheterotróficos ou fotorganotróficos: usam luz como fonte de energia e compostos orgânicos (álcool, carboidratos, ácidos orgânicos, etc.) como fonte de carbono. São as bactérias verdes não sulfurosas (exemplo: *Chloroflexus*) e as bactérias púrpuras não sulfurosas (exemplo: *Rhodopseudomonas*).

Os microrganismos que obtêm energia através da oxidação de compostos orgânicos ou inorgânicos podem ser classificados em:

Quimioautotróficos ou quimiolitotróficos: usam os compostos químicos (gás sulfídrico (H_2S), enxofre elementar (S), amônia (NH_3), gás hidrogênio (H_2), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) e ferro (Fe^{2+}) como fonte de energia e usam o CO_2 como fonte de carbono.

Quimioheterotróficos ou quimiorganotróficos: são organismos que usam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono. Este grupo inclui a maioria das bactérias, fungos e protozoários.

Principais tipos nutritivos das bactérias

TIPO	FONTE DE ENERGIA PARA CRESCIMENTO	FONTE DE CARBONO PARA CRESCIMENTO	EXEMPLO DE GÊNERO
Fototrófico			
Fotolitotrófico (autotrófico)	luz	CO_2	*Chromatium*
Fotorganotrófico (heterotrófico)	luz	composto orgânico	*Rhodopseudomonas*
Quimiotrófico			
Quimiolitotrófico (autotrófico)	oxidação de composto inorgânico	CO_2	*Thiobacillus*
Quimiorganotrófico (heterotrófico)	oxidação de composto orgânico	composto orgânico	*Escherichia*

MEIOS DE CULTURA

Meios Sintéticos: são meios de composição química definida (pouco uso).

Ágar ou caldo nutritivos: meios com adição de extrato de carne, peptona, agar, extrato de levedura. Promovem o desenvolvimento de uma ampla gama de microrganismos.

Escolha do meio:
Envolve: tipo/grupo microbiano (bactérias, fungos, algas)
Ex.: *Escherichia coli* / tipo selvagem é prototrófico (autosuficientes).
Mutantes são auxotróficos (nutricionais)

Fungos de maneira geral exigem pouco nitrogênio para crescer.

Tipos de meios: Considerando que alguns microrganismos heterótrofos apresentam exigências nutricionais específicas – heterótrofos fastidiosos -, as quais não são supridas pelo caldo nutritivo/ou agar, existem meios especiais que permitem o estudo destes heterótrofos.

1. **Meios enriquecidos:** são adicionados: sangue, soro ou extratos de tecidos animais ou vegetais ao caldo/ou ágar nutritivos, o que proporciona nutrientes acessórios.

2. **Meios seletivos:** (Figura 1) - certas substâncias adicionadas ao meio selecionam um grupo, impedindo o crescimento de outro.

2.1. Ex: O cristal violeta 1:200.000 a 1:300.000 – Impede o crescimento das bactérias Gram-positivas, enquanto a *Escherichia coli* (Gram-negativa) é sensível a uma concentração 10 x maior.

2.2. Ex: Sendo a maltose a única fonte de carbono no meio. A ausência de outras fontes de carbono irá selecionar aqueles microrganismos que utilizam a maltose como fonte de energia.

3. **Meios Diferenciais:** (Figura 2) - servem para diferenciar tipos específicos de microrganismos; as substâncias incorporadas ao meio, resultam num tipo de crescimento ou modificação do meio.
   Ex: Inoculando-se uma mistura de bactérias no meio de ágar-sangue verifica-se: Zonas claras ao redor da colônia – Bactérias hemolíticas (causam hemólise).
   Pode-se diferenciar bactérias hemolíticas das não-hemolíticas.
   OBS.: Ágar-sangue serve como meio enriquecido e diferencial.

4. **Meios de dosagem:** de composição definida, são empregados para dosagem de vitaminas, aminoácidos e antibióticos. Podem ser utilizados para avaliar a eficiência de desinfetantes.

5. **Meios para contagem de bactérias**: sua composição obedece a recomendações prescritas. São meios específicos indicados para determinar o conteúdo bacteriano da água e o leite.

6. **Meios para a identificação:** existe uma grande variedade de meios para bactérias e fungos, cuja finalidade é auxiliar na identificação. Seguindo-se as recomendações e as condições de cultivo, pode-se determinar o crescimento, características da colônia e alterações no meio.

7. **Meios de estocagem ou manutenção:** A manutenção adequada da viabilidade e das características fisiológicas de uma cultura pode exigir um meio diferente daquele que é recomendado para o seu crescimento ótimo. Por exemplo: 1) o rápido e luxuriante desenvolvimento pode estar associado à morte de células; 2) glicose no meio favorece o crescimento, mas libera ácidos. Em meios de estocagem deve-se evitar o seu uso.

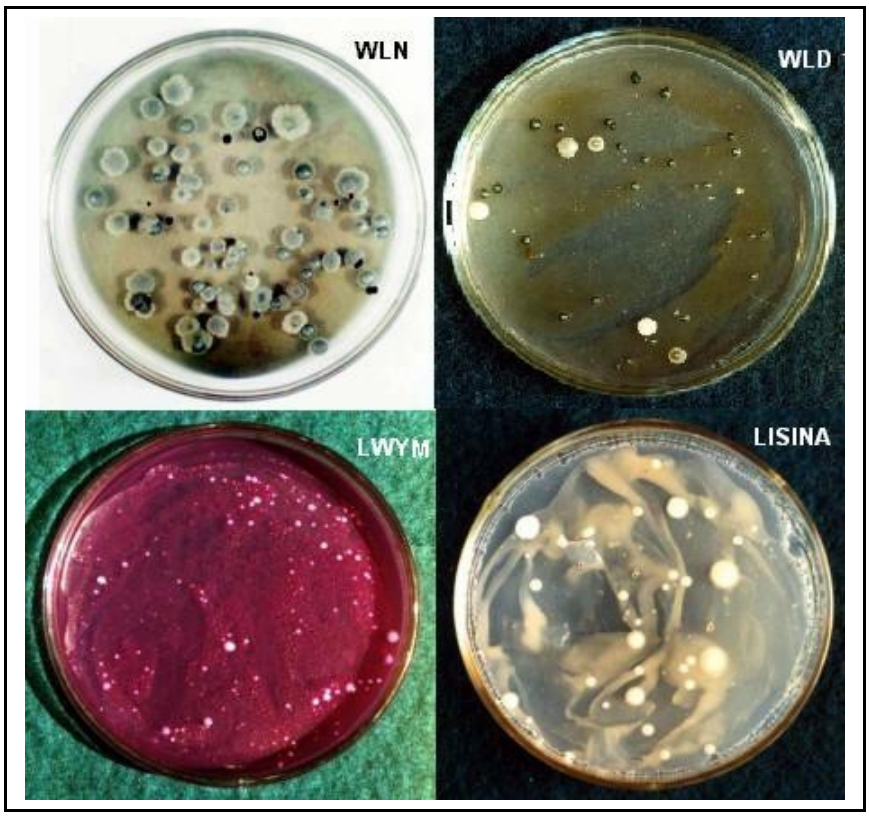

Figura 1. Fotografias das placas contendo os meios seletivos WLD, Ágar-Lisina, LWYM, (amostras sem diluição) e do meio de contagem geral WLN (diluição 10^{-10}). Nos 3 primeiros meios, são isoladas leveduras não *Saccharomyces* (Lisina) ou *Saccharomyces* não *cerevisiae* (LWYM e WLD), pela adição de substâncias como cristal-violeta (LWYM) e actidione (WLD), às quais *S. cerevisiae* é sensível, e lisina como única fonte de carbono (meio de Lisina), a qual linhagens de *Saccharomyces* não são capazes de utilizar. Desta forma, pode-se avaliar o nível de contaminação por outras leveduras que não a do processo fermentativo para produção de etanol (*S. cerevisiae).* As fotos são pertencentes à profa. Sandra R.C.Antonini.

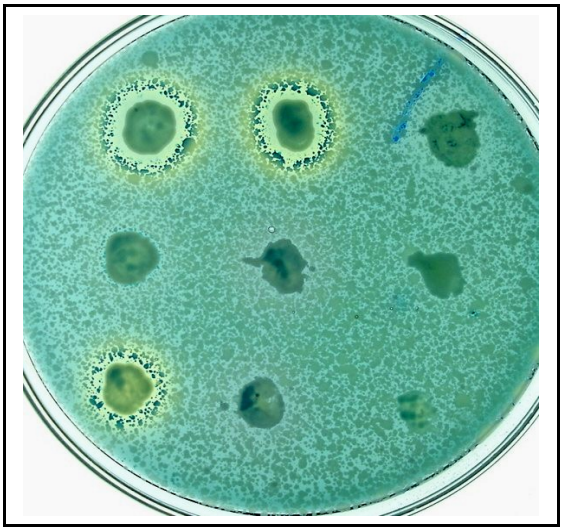

Figura 2. Fotografia de placa com meio diferencial YEPD-azul de metileno, tamponado com tampão citrato, pH 4,3-4,5 e inoculado com uma linhagem sensível para verificação de atividade *killer* de leveduras selecionadas. As colônias de leveduras que apresentam halo de inibição e zona azul ao redor do halo (primeira e segunda, primeira linha, da esquerda para a direita; e a primeira, última fila, da esquerda para direita) são consideradas *killer* enquanto as outras não apresentam atividade *killer* . A toxina *killer* é uma proteína de baixo peso molecular que é tóxica para algumas leveduras. A fotografia foi retirada da dissertação de mestrado de Christiann D. Tosta.

CONDIÇÕES FÍSICAS NECESSÁRIAS AO CRESCIMENTO

1. **TEMPERATURA**
   - **i.** Psicrófilos – crescem a 0ºC ou menos - ótimo pode ser 15 – 20ºC
   - **ii.** Mesófilas – faixa: 25 – 40ºC
   - **iii.** Termófilos – faixa: 45 – 60ºC
     - Euritermófilos (facultativas) – faixa ampla
     - Estenotermófilos (termófilos verdadeiras, obrigatórias) – faixa estreita.

- A temperatura pode ser utilizada como fator seletivo. Ex: Calor 85ºC elimina as formas vegetativas e não elimina esporos de bactérias.
- Temperatura ótima: permite rápido desenvolvimento num curto espaço de tempo.

- a temperatura ótima, como foi definida, pode não ser a ideal para outras atividades.

2. EXIGÊNCIAS ATMOSFÉRICAS: CO_2 e O_2

Os microrganismos podem crescer na presença ou ausência de oxigênio e, neste aspecto, podem ser classificados em:

Aeróbios: são os microrganismos que normalmente requerem oxigênio para crescer.

Facultativos: são os microrganismos que crescem na presença de oxigênio ou na ausência dele (anaerobiose).

Anaeróbios: são os microrganismos que ou crescem na presença de baixas concentrações de oxigênio, os chamados de anaeróbios facultativos, ou morrem quando estão na presença deste gás; estes são os chamados de anaeróbios estritos.

Microaerófilos: são organismos aeróbios, porém somente crescem em concentrações de oxigênio menores que a do ar (entre 1% e 15%).

3. pH – ACIDEZ E ALCALINIDADE

Bactérias: pH ótimo – 6,5 e 7,5 (neutro)
Fungos: pH ótimo ao redor de 5,0 (ácido)

O uso de tampões ajuda a impedir variações bruscas do pH durante o período de incubação. A combinação KH_2PO_4 e K_2HPO_4 é largamente empregada em meios de cultura bacteriológicos.

MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE CULTURAS PURAS

As coleções de culturas de estoque visam:

- Aulas práticas de laboratório
- Trabalhos de pesquisa
- Reagentes em determinados processos.

Obs.: As culturas puras devem ser mantidas em condições adequadas, que mantenham as características culturais e identificadas, permitindo assim o seu uso facilmente.

MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

1. **Transferência para novos meios periodicamente.**
   Cuidados: i) verificar os meios adequados para cada espécie
   ii) temperatura de estocagem
   iii) período de transferência do repique
   iv) cuidar para que não haja contaminação da cultura

2. Conservação de culturas sob camada de óleo mineral .

i) cobrir o meio com óleo mineral estéril (1 cm)

Considerações: Tempo – varia conforme a espécie, algumas mantêm-se viáveis por anos.

Uma parte da cultura pode ser retirada para repique sem prejudicar o material conservado.

3. **Liofilização:** Processo que consiste na remoção da água de uma suspensão de microrganismos congelados por sublimação sob pressão reduzida.
   Considerações: Longa estabilidade (viabilidade)
   Fácil estocagem (pequeno volume)

4. **Estocagem a baixas temperaturas**
   Nitrogênio líquido (-196º C) – agente protetor (glicerol ou dimetil sulfóxido)
   Considerações: é um processo eficaz e pode substituir a liofilização, quando as amostras não podem ser liofilizadas.

COLEÇÕES DE CULTURAS

- American Type Culture Collection (ATCC) – Rockville - Maryland - EUA
- Instituto Pasteur – Paris
- National Collection of Type Cultures – Londres
- Japanese Type Culture Collection – Tókio.
- Nacional Collection of Yeast Cultures (NCYC) – Norwich, Inglaterra