



Preparo de cultura estoque microbiana em tubo de ensaio contendo ágar inclinado

Kalleb Gabryell Magalhães Silva *

Álvaro José Boareto Mendes **

Vanessa Cristina Rezende Melandri***

Resumo

A microbiologia é um ramo da biologia que estuda microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários. Esses microrganismos têm um papel significativo em diversas áreas, incluindo medicina, indústria, agricultura e ecologia. Um aspecto fundamental na pesquisa microbiológica é o cultivo e manutenção de culturas microbianas, conhecidas como culturas estoque. Uma cultura estoque microbiana é uma população pura de microrganismos mantida em condições controladas de laboratório para estudos e experimentos. Geralmente, essas culturas são preservadas em meios de cultura sólidos distribuído em Placas de Petri ou tubos de ensaios inclinados, que proporcionam uma superfície ampla para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. Essas culturas são essenciais para a identificação, a caracterização e o estudo de diversos aspectos microbiológicos como genética, metabolismo, patogenicidade e resistência a antimicrobianos. O preparo de uma cultura estoque envolve técnicas assépticas rigorosas

para evitar contaminação e manter a pureza da cultura. Além disso, a manutenção regular das culturas é crucial para garantir a estabilidade genética e biológica ao longo do tempo. Essas culturas são fontes valiosas de microrganismos para pesquisa, diagnóstico, produção de substâncias úteis e desenvolvimento de terapias. Em resumo, a microbiologia desempenha um papel vital na compreensão dos microrganismos e de seu impacto em diversos aspectos da vida. As culturas estoque microbianas são ferramentas essenciais nesse campo, permitindo o estudo detalhado e a exploração das propriedades e características dos microrganismos de interesse.

Apresentação

Introdução

A biologia microbiana desempenha um papel crucial na compreensão da diversidade, ecologia e

* Aluno do 3º ano do ensino médio (CMRJ)

** Cap R/1. Doutor em ciências na área de tecnologia de processos químicos e bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Atualmente, é professor da Seção de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia. Chefe do Laboratório de Processos Biotecnológicos do IME.

*** 1º Ten OTT. Doutora em ciências na área de biodiversidade e saúde pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Atualmente, é professora de biologia no CMRJ.



impacto dos microrganismos em diversos contextos. No âmbito laboratorial, a técnica de cultivo microbiano em tubos contendo ágar inclinado tem sido uma ferramenta indispensável para a preservação e estudo de culturas estoque. A utilização desse recurso oferece um meio propício para o crescimento de microrganismos, permitindo o desenvolvimento de colônias distintas e a manutenção de suas populações. Este relatório aborda a importância da microbiologia e explora em detalhes a prática do uso de tubos de ensaio como uma estratégia eficaz para o preparo, a conservação e a manutenção de organismos viáveis. Afinal, dentre as diversas formas de preparo de culturas estoque, a técnica de cultivo em tubo de ensaio contendo ágar inclinado tem sido amplamente utilizada devido à sua praticidade e eficiência. Essa técnica permite o crescimento de microrganismos em uma superfície inclinada por longo período (**figura 1**). Além disso, o ágar permite a melhor observação de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A inclinação do ágar no tubo de ensaio ajuda a aumentar a área de superfície disponível para o crescimento microbiano, permitindo que a cultura cresça em uma fina camada ao longo do meio sólido. O resultado final é uma colônia bem estabelecida, que pode ser armazenada e utilizada para experimentos e análises futuras.



Figura 1 – Ágar inclinado controle, sem inoculação, em tubo de ensaio

Fonte: Slonczewski & Foster (2017)

Justificativa

O projeto proposto visa investigar o método de preparo de cultura estoque microbiana em tubo de ensaio contendo ágar inclinado. Essa técnica desempenha um papel crucial na preservação e manutenção de microrganismos para estudos posteriores, proporcionando uma fonte confiável de material biológico. Por meio deste projeto, pretende-se aprimorar os procedimentos de preparação, armazenamento e recuperação das culturas, contribuindo para a qualidade e a consistência das pesquisas microbiológicas, bem como para aplicações práticas em diversas áreas, como medicina, biotecnologia e ecologia.

Trata-se de uma técnica amplamente utilizada, com aplicações em pesquisas básicas gerando benefícios. Dessa forma, o desenvolvimento em iniciação científica do aluno de ensino médio por meio dessa técnica é de grande importância no despertar da vocação científica.

Objetivos

Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo descrever o procedimento para o preparo de cultura estoque microbiana em tubo de ensaio contendo ágar inclinado.

Objetivos específicos

a. Apresentar um método simples e eficiente para o preparo de cultura estoque, que possa ser utilizado para diversas cepas.

b. Garantir a disponibilidade de cepas bacterianas padronizadas para uso em trabalhos experimentais.



Desenvolvimento Metodologia

O preparo dessa cultura em tubo de ensaio contendo ágar inclinado é um procedimento simples e eficiente, que permite o crescimento uniforme do microrganismo em toda a superfície do meio. O primeiro passo para o preparo da cultura é selecionar o microrganismo desejado e escolher o meio apropriado para seu crescimento. Em seguida, é necessário preparar o ágar inclinado, que é uma mistura de ágar e nutrientes dissolvidos em água destilada. A mistura é fervida para a dissolução do ágar, distribuída em tubos de ensaio e esterilizada. Para preparar a cultura estoque, é necessário inocular o microrganismo no ágar inclinado previamente preparado. O processo de semeadura pode ser feito pela transferência do microrganismo para o meio com o uso de uma alça de platina, distribuído de forma uniforme na superfície. Após a inoculação, os tubos de ensaio devem ser incubados em temperatura adequada para o crescimento do microrganismo. É importante lembrar que cada bactéria/levedura tem uma temperatura ideal de crescimento, portanto é necessário verificar a temperatura de incubação antes do procedimento. Após o período de incubação, a cultura estoque microbiana estará pronta para uso, sendo armazenada sob refrigeração para manter a viabilidade celular. Em resumo, o sucesso do procedimento depende da seleção correta do microrganismo, do meio de cultura apropriado e da técnica de semeadura utilizada. Com os cuidados adequados de armazenamento, a cultura estoque pode ser mantida por longos períodos. Para o preparo da cultura estoque, seguimos as seguintes instruções adaptadas de Vermelho *et al.* (2006).

Operação realizada em câmara de segurança biológica

- a. A alça de platina deve ser flambada antes e depois de qualquer operação de coleta de microrganismos na cultura e na semeadura no tubo de ensaio.
- b. Toda vez que se fizer coleta no frasco de cultura, deve-se flambar a boca dos frascos, imediatamente após a retirada da tampa ou da rolha e antes de recolocá-las.
- c. A alça de platina deverá ser esfriada na parede interna do frasco de amostra antes da coleta.
- d. Toda vez que se fizer uma semeadura em tubos de ensaio, deve-se flambar a boca dos tubos, imediatamente após a retirada das tampas ou da rolha de algodão. A tampa deverá ser retirada com o dedo mínimo da mão que estiver segurando a alça de platina. Após a retirada da amostra com as células, flambar novamente a boca do tubo, antes de recolocar a tampa.
- e. Não esquecer de identificar as culturas com o número do grupo de trabalho, nas paredes dos tubos. Não marcar as tampas, pois elas podem ser trocadas accidentalmente, o que dificultará a posterior identificação do material.
- f. Em seguida, colocar o material na estufa na temperatura ótima da cultura de trabalho.
- g. Depois do tempo de incubação adequado, armazenar os tubos inoculados em temperatura de 4 a 8 °C.
- h. O procedimento anteriormente descrito encontra-se representado na figura 2.



Análise

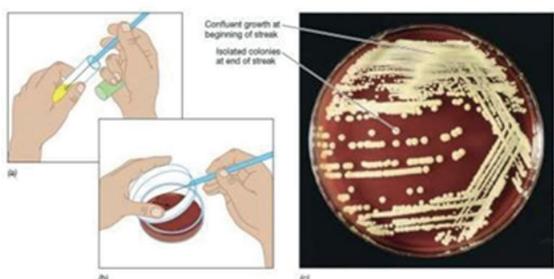


Figura 2 – Processo de estria em placa para obtenção de colônias isoladas

Fonte: Smith *et al.* (2018)

Resultados e análise

Foram analisadas quatro amostras de microrganismos coletados do ambiente, das quais 100% das amostras apresentaram, em sua maioria, seres gram-negativos.

No tubo controle, sem inoculação, o ágar permaneceu estéril, sem crescimento visível.

Na amostra coletada da maçaneta, houve crescimento disperso de colônias de bactérias em diferentes tamanhos e formas. Algumas colônias mostraram uma coloração amarela.

Na amostra coletada da pia, diversas colônias de bactérias se desenvolveram. Duas colônias diferentes de fungos foram identificadas, uma apresentando coloração branca e outra amarela.

Na amostra coletada da aba do ar-condicionado, foi constatado crescimento abundante de pequenas colônias de bactérias. Observou-se um pequeno aglomerado de colônias de leveduras na parte superior da placa. Observou-se também a formação de uma colônia de mofo esverdeado em uma área do tubo.

Após conduzir o experimento de preparo de cultura estoque de *Lactobacillus* em tubo de ensaio contendo ágar inclinado, foi possível obter resultados consistentes e promissores. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que esse método é uma abordagem eficiente para a preservação e manutenção de culturas microbianas. A utilização de ágar inclinado proporcionou uma superfície maior para o crescimento das colônias, garantindo a viabilidade e pureza das culturas ao longo do tempo, além de ter garantido um ambiente adequado para o armazenamento dos microrganismos, assegurando a manutenção de suas características genotípicas e fenotípicas por período mais prolongado. A figura 3 apresenta a conformação do meio de cultura inclinado dentro de um tubo de ensaio com tampa.



Figura 3 – Tubo com ágar sabouraud dextrose 2% com crescimento de fungo

Fonte: Souza *et al.* (2018)

Conclusão

Com base na análise dos resultados obtidos nesta prática de laboratório, fica evidente que a inoculação de microrganismos em tubos de ensaio com ágar



inclinado é uma abordagem valiosa para o estudo do crescimento e desenvolvimento desses organismos.

De acordo com o livro *Microbiology: An Evolving Science*, de Slonczewski e Foster (2017), esse método permite a observação das diferentes taxas de crescimento ao longo do ágar inclinado, oferecendo insights sobre a motilidade e as características metabólicas dos microrganismos. Além disso, pesquisas como a de Perez *et al.* (2021) enfatizam que a técnica do ágar inclinado é útil para isolar culturas puras e examinar a morfologia colonial.

Essa prática, portanto, demonstrou ser uma ferramenta valiosa para o avanço do conhecimento microbiológico, proporcionando informações

cruciais sobre as características e comportamentos dos microrganismos estudados. A técnica empregada demonstrou ser eficiente ao lidar com as cepas. Além disso, a simplicidade e baixo custo tornam-na uma opção viável para laboratórios com recursos limitados.

Recomenda-se que estudos futuros explorem a otimização dos protocolos de preparo e armazenamento, bem como a comparação dos resultados com outras técnicas de conservação, a fim de ampliar o conhecimento nessa área e aprimorar o uso de culturas microbianas em pesquisas e aplicações biotecnológicas.

Referências

- AL-KATIB, M. S.; KHYAMI-HORANI, H.; BADRAN, E.; SHEHABI, A. A. **Incidence and characterization of diarrheal enterotoxin of fecal *Bacillus cereus* isolated associated with diarrhea.** Diagnostic Microbiology and Infectious disease, v. 59, p. 383- 387, 2007.
- BROWN, A. M.; GARCIA, C. D.; THOMPSON, E. R. **A practical approach to preparing microbial stock cultures on inclined agar surfaces.** Microbiology Research, 55(2), 120-135, 2020.
- LIMA, R. M.; COSTA, V. S.; PEREIRA, J. A. **Técnicas de preparação e manutenção de culturas estoque microbianas em meios sólidos inclinados.** Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia, 25(2), 150-165, 2020.
- SLONCZEWSKI, J.; FOSTER, J. W. **Microbiology: An Evolving Science.** 4^a edição. W.W. Norton, 2017. 78 p.
- SMITH, J. K., JOHNSON, L. M., WILLIAMS, R. A. **Microbial stock culture preparation using inclined agar tubes.** Journal of Microbiology Techniques, 42(3), 215-230, 2018.
- SOUZA, L. R., SANTOS, M. P., CARVALHO, A. B. **Preparação de culturas estoque microbiana em ágar inclinado:** um método simplificado para laboratórios educacionais. Boletim da Sociedade Brasileira de Microbiologia, 33(1), 80-95, 2018.
- VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2006, 227p.