



Aplicação de técnicas de isolamento de microrganismos

Clara Lourenço Kronenberger *

Álvaro José Boareto Mendes **

Vanessa Cristina Rezende Melandri ***

Resumo

A partir de uma cultura que apresente várias espécies microbianas, é necessária a aplicação de técnicas de isolamento de microrganismos para possibilitar o estudo individualizado das características das espécies nela contidas. Assim, esta pesquisa buscou aplicar técnicas de esgotamento e de diluições em placa para o isolamento de microrganismos. Para tal, foi preparada previamente uma amostra de 500ml de meio líquido MRS contendo uma quantidade de lactobacilos equivalente a um sachê do probiótico em pó da marca Simfort. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri utilizando a técnica de esgotamento. Os resultados obtidos após o crescimento da cepa mostraram que as colônias não apresentaram características macroscopicamente distinguíveis. O presente trabalho teve por objetivo aplicar técnicas de isolamento em uma amostra de probiótico, utilizando os métodos do esgotamento e da diluição em placa para obtenção de culturas puras.

Apresentação

Introdução

Originada a partir da junção dos vocábulos gregos *mikros* e *bios*, a palavra “micróbio”, que significa literalmente “pequena vida”, é utilizada para referir-se aos microrganismos. Os microrganismos são seres vivos de tamanho tão reduzido que podem ser visualizados apenas através do uso de um microscópio.

No meio ambiente, as populações microbianas encontram-se aos bilhões e em composição não homogênea, contendo uma grande variedade de bactérias e outros microrganismos. Tal condição evidencia a necessidade do desenvolvimento de técnicas que possibilitem o isolamento dessas espécies. No laboratório, essas culturas mistas podem ser separadas em culturas puras, ou seja, culturas que apresentem apenas um tipo de microrganismo e que são essenciais para a identificação e o estudo das características morfológicas, genéticas e bioquímicas da espécie a ser estudada (Padilla *et al.*, 2018).

* Aluna 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.



Dentro do universo das diversas técnicas de isolamento de cultura pura, as habitualmente utilizadas pela comunidade científica são a técnica do esgotamento e a técnica das diluições seriadas. Ambas são fundamentadas na premissa de que uma única célula microbiana, ao ser introduzida em um meio de cultura sólido adequado e submetida a condições de incubação que propiciem o crescimento do microrganismo desejado, originará uma colônia (Vermelho *et al.*, 2006). Essa colônia, macroscopicamente visível, é um aglomerado de bactérias que resultou da multiplicação de uma única bactéria depositada na superfície do meio sólido no momento da semeadura. Uma vez que as colônias são individualizadas e identificadas, elas podem ser transferidas assepticamente para outra placa de Petri com meio sólido, obtendo, desse modo, uma cultura pura (Padilla *et al.*, 2018).

A partir de uma cultura que apresente várias espécies microbianas, é necessária a aplicação de técnicas de isolamento de microrganismos para possibilitar o estudo individualizado das características das espécies nela contidas. No âmbito desta pesquisa, as técnicas de isolamento de microrganismos foram aplicadas visando possibilitar o estudo posterior da variedade de lactobacilos presentes no probiótico da marca Simfort.

Justificativa

O trabalho busca desenvolver e aplicar as técnicas de isolamento de microrganismos. Esses métodos são amplamente utilizados pela comunidade científica internacional, evidenciando seu papel fundamental na condução de diversas pesquisas experimentais, visto que propiciam um estudo mais particularizado

e mais preciso das características morfológicas, genéticas e bioquímicas das diferentes espécies, que, anteriormente, encontravam-se em populações mistas.

Objetivos

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo aplicar técnicas de isolamento em uma amostra do probiótico, de modo a obter culturas puras.

Objetivos específicos

- Preparar o meio de cultura adequado para o crescimento de bactérias probióticas.
- Aplicar técnicas de diluições seriadas.
- Proceder à inoculação e incubação dos microrganismos selecionados.
- Observar as culturas geradas para identificação de diferenças macroscópicas.
- Inocular novas placas de Petri para obtenção de culturas puras.

Desenvolvimento

Metodologia

Para a condução da pesquisa, foi utilizada uma amostra equivalente a um sachê do probiótico Simfort (**figura 1**). O probiótico usado continha cinco espécies de bactérias (**tabela 1**). Os 2 gramas de pó contidos no sachê foram diluídos em 500ml de meio líquido MRS (**figura 2**). Após a ativação dessas bactérias, uma parte dessa amostra foi transferida



para um Erlenmeyer para facilitar o manuseio do material.

Lactobacillus acidophilus	10^9 UFC
Lactobacillus casei	10^9 UFC
Lactococcus lactis	10^9 UFC
Bifidobacterium lactis	10^9 UFC
Bifidobacterium bifidum	10^9 UFC

Tabela 1 – Gênero, espécie e concentração de lactobacilos presentes no probiótico empregado no estudo

Fonte: A autora, 2023



Figura 1 – Produto utilizado como fonte para a amostra de cinco espécies de lactobacilos

Fonte: A autora, 2023

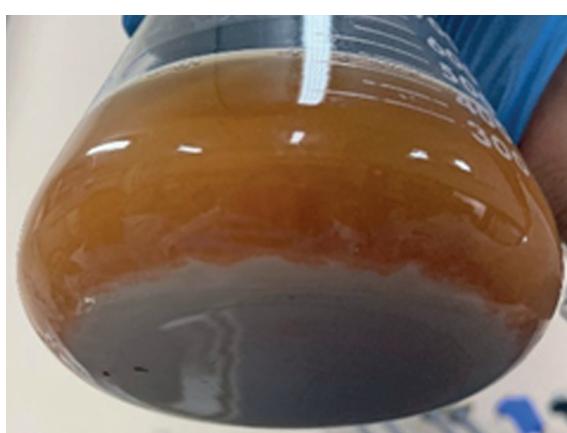


Figura 2 – Meio líquido MRS após o período de incubação e ativação das bactérias presentes no sachê de Simfort

Fonte: A autora, 2023

Para o plaqueamento das bactérias, foram preparadas seis placas de Petri com 20ml de MRS sólido, sendo uma destinada como grupo controle. Assim, a inoculação no meio de cultura foi realizada pela técnica de esgotamento. O primeiro passo a ser realizado é mergulhar a alça de platina, depois de devidamente flambada e resfriada, no meio de cultura líquido com as bactérias. Após isso, a alça deve ser levada até a placa de Petri contendo o meio de cultura sólido e realizar uma sucessão de estrias não sobrepostas divididas em três setores (**figura 3.a**). Essa ação tem o objetivo de, progressivamente, diminuir a quantidade de material microbiano que é transferido da alça à placa, para que, ao final da técnica e do período de crescimento dos microrganismos, seja possível um isolamento visual de parte das colônias ainda na placa de Petri original (**figura 3.b**). As placas devem ser incubadas a 37°C por um período de 24 a 48 horas, para que seja possível a visualização das colônias isoladas obtidas.

Para isolamento dos lactobacilos visando permitir a contagem das células microbianas, pode-se aplicar a técnica de diluição em placas (diluição seriada). Essa técnica é promovida pela inoculação das colônias de espécies bacterianas, selecionadas de acordo com características macroscópicamente visíveis e distinguíveis, para placas de Petri separadas, isolando-as definitivamente. É indispensável que toda a prática seja realizada em uma câmara de fluxo laminar, de modo a garantir a esterilidade em todo o processo.

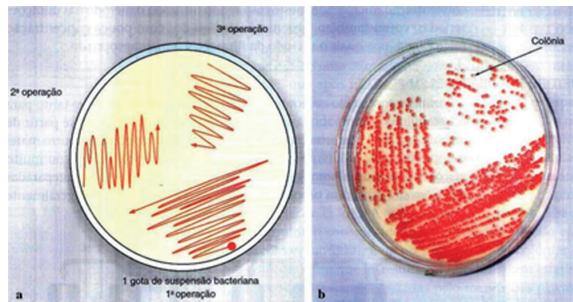


Figura 3 – Esquema do procedimento da técnica de esgotamento (a) e representação de uma colônia isolada após a aplicação da técnica de esgotamento (b)

Fonte: Vermelho *et al.*, 2006

Resultados e Análise

Após o crescimento das bactérias que foram inoculadas nas placas de Petri a partir da técnica de esgotamento, foi possível observar que as cinco espécies de lactobacilos não possuíam características individualizadas em nível macroscópico (**figura 4**), impossibilitando a separação para obtenção das culturas puras.



Figura 4 – Resultado do crescimento da cultura de bactérias presentes no probiótico Simfort

Fonte: A autora, 2023

Apesar desse impedimento, verificou-se a eficácia da utilização do esgotamento como técnica laboratorial de inoculação de microrganismos em placas de Petri, uma vez que o objetivo de diminuir a concentração das colônias de bactérias pela sequência de estrias foi alcançado.

É possível verificar o sucesso da aplicação da técnica do isolamento em outros trabalhos científicos, como a pesquisa conduzida por Silva *et al.* (2020) para a identificação de cepas do gênero *lactobacillus* com potencial probiótico isoladas do trato gastrointestinal de suínos (**figura 5**).



Figura 5 – Resultado da aplicação da técnica de esgotamento em pesquisa científica

Fonte: Silva *et al.*, 2020

Conclusão

É possível afirmar que a aplicação das técnicas de isolamento de microrganismos na amostra do probiótico ocorreu dentro do previsto. O método de esgotamento provou-se eficaz em seu objetivo



de diminuir sucessivamente a quantidade de material biológico no meio de cultura em placa de Petri, embora tenha sido observada a inviabilidade da distinção entre as cinco espécies bacterianas presentes no produto utilizado.

Ademais, o trabalho foi essencial para evidenciar a importância das técnicas de isolamento de microrganismos para a área científico-experimental, apresentando-se como uma metodologia indispensável,

especialmente para a condução de pesquisas que visem o estudo de seres microscópicos encontrados em populações mistas. Recomenda-se a elaboração de projetos que busquem analisar outros probióticos farmacêuticos e demais produtos que apresentem uma variedade de micróbios em sua composição, com a finalidade de viabilizar o estudo das variadas características que essas populações podem exibir.

Referências

- GASPARETTO, Isabella. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de probióticos em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri*.** Campinas, SP, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/Busca/Download?codigoArquivo=4494114>.
- HERNANI, Luis Carlos. **Microrganismos**, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/sistema-plantio-direto/fundamentos/beneficios/ao-solo/biologia-do-solo/microrganismos>.
- PADILLA, Gabriel, et al. **Apostila das Aulas Práticas Microbiologia Básica para Farmácia**. São Paulo, 2018.
- SILVA, Paola Coutinho de, et al. **Identificação de cepas do gênero *lactobacillus* com potencial probiótico isoladas do trato gastrointestinal de suínos**. Volta Redonda, RJ, 2020. Disponível em: <http://revista.ugb.edu.br/ojs302/index.php/episteme/article/view/2132/1303>.
- VERMELHO, Alane Beatriz; et al. **Práticas em Microbiologia** [S.I]: Guanabara Koogan, 2006.