



Preparo de meio de cultura em estado líquido e sólido para crescimento microbiano

Pedro Soares de Lima Filho*

Kemilly da Costa Cesso Tavares**

Álvaro José Boareto Mendes***

Vanessa Cristina Rezende Melandri****

Resumo

Dentro de um contexto em que a falta de estímulo à educação parece ser inerente ao país, a apresentação do mundo científico e o despertar do imaginário quanto às possibilidades para os jovens de nível médio são de extrema importância para a reversão desse cenário. Dessa forma, o trabalho buscou apresentar a importância da ciência dentro da sociedade por meio da biotecnologia, que desempenha um papel fundamental na exploração das capacidades dos microrganismos para a produção de substâncias úteis para a sociedade e para compreender os processos biológicos subjacentes. O trabalho explorou a aplicação de técnicas básicas em um laboratório de biotecnologia, com um enfoque específico no preparo de meios de cultura em estados líquido e sólido para o crescimento

de microrganismos, que é um passo crucial para garantir o crescimento e a proliferação microbiana controlada, permitindo a realização de investigações científicas e aplicações práticas. Para tal projeto foi utilizado o livro *Práticas de Microbiologia* (Vermelho *et al.*, 2017) e *Manual de Cultivo de Cianobactérias* (Cybis *et al.*, 2006) como referências bibliográficas principais.

Apresentação

Introdução

A natureza impõe, em seu curso normal, que materiais biológicos sigam o ciclo de degeneração e morte. Dessa forma, algumas características podem

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

** 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. Professor da Seção de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia. Atualmente, é 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.



se alterar e se perder, com o passar do tempo. A intenção de interromper ou pelo menos retardar o relógio biológico de organismos tem sido perseguido desde os tempos mais remotos, tendo alcançado hoje um potencial significativo de estocagem de amostras biológicas a curto, médio e longo prazo.

Nesse sentido, o incremento de protocolos mais eficientes de conservação de microrganismos poderá assegurar, de certa forma, a continuidade e expansão de pesquisas nessa área. Tal ação permite o desenvolvimento de estudos capazes de superar barreiras cronológicas e geográficas e, por conseguinte, elucidar as particularidades dos diferentes organismos.

A compreensão do papel de microrganismos no meio ambiente fornece subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, visto o caráter patogênico de muitos agentes.

A importância da manutenção e, especialmente, preservação de microrganismos caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização de organismos ou espécimes a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos. Dessa forma, conhecer a melhor maneira de preservar culturas bacterianas e dispor de técnicas simples e eficientes revestem-se de grande valia aos laboratórios de microbiologia.

O presente relatório visa fornecer uma perspectiva mais detalhada sobre o processo de preparo de meios de cultura em estado líquido e sólido, realizado por um aluno de nível médio, considerando não apenas os aspectos teóricos, mas também os resultados práticos de experimentos realizados em laboratório.

Para o entendimento total da pesquisa, é preciso esclarecer o conceito de meio de cultura, que é um insumo preparado em laboratório que fornece os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos em um ambiente controlado.

A importância da compreensão aprofundada dessas técnicas vem de obter-se resultados precisos e confiáveis nas pesquisas e análises microbiológicas, já que, nesse ramo, há necessidade do preparo adequado de meios de cultura.

Justificativa

A relevância deste projeto advém particularmente do despertar de interesse de jovens no ramo de ciência, contribuindo para o avanço contínuo da pesquisa e suas diversas aplicações para a sociedade.

Os processos de isolamento, identificação, conservação e utilização de microrganismos vêm sendo considerados como rotina para o desenvolvimento de pesquisas e obtenção de produtos de interesse econômico (Abreu & Tutunji, 2004). No âmbito da ciência, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (Girão *et al.*, 2004).

Segundo o trabalho de DePaoli, diante da necessidade de preservação de microrganismos, muitas vezes, busca-se conservar um agente que foi selecionado e melhorado com intuito de manter sua nova identidade. Ainda assim, o objetivo da manutenção de um microrganismo não é somente conservar seu estado inicial, evitando mutações



indesejáveis, mas também garantir ao máximo a vitalidade das células e a quantidade de células viáveis (De Paoli, 2005).

Dessa forma, é importante o fornecimento de meios de cultura controlados para o bom andamento das outras etapas.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral do projeto é a apresentação do mundo científico e o despertar da mente quanto às possibilidades para os jovens do ensino médio por meio das aplicações práticas do método científico dentro do ramo da biotecnologia.

Objetivos específicos

Este projeto tem por objetivo específico fornecer uma visão mais detalhada sobre o processo de preparo de meios de cultura e mostrar os resultados obtidos em aplicações práticas feitas em laboratório.

Desenvolvimento Metodologia

Materiais

Tomando por base as instruções presentes no livro *Manual de Cultivo de Cianobactérias*, de Luiz Fernando Cybis, Maria Mercedes Bendati, Carmem Rosalia Marodin Maizonave, Vera Regina Werner e Carolina Davila Domingues, temos:

Para esterilização:

– autoclave – esterilização de vidraria, meios de cultura e descarte das cepas;

– câmara de fluxo laminar, equipada com:

– bico de Bunsen – esterilização de materiais utilizados no momento da transferência e inoculação das cianobactérias;

– lâmpada germicida (UV) – esterilização do fluxo laminar e da sala de repicagem e isolamento;

– estufas para esterilização e secagem;

– estojos para autoclavagem de pipetas e tubos.

Para preparo e conservação dos meios de cultivo:

– vidraria: Erlenmeyer: 50ml, 100ml, 200ml, 500ml, 1L, 2L e 4L; proveta: 50ml, 100ml, 500ml, 1L e 2L; pipeta graduada: 5ml, 10ml e 20ml; balão volumétrico: 1L e 2L; Becker: 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1L;

– agitador magnético, potenciômetro, balança analítica e frascos plásticos: 100ml, 500ml, 1L e 2L;

– freezers, refrigeradores e pêra de sucção.

Meio de cultura

Os meios de cultura são utilizados com a finalidade de isolar e cultivar os microrganismos em laboratório, geralmente em culturas uniespecíficas. Um meio de cultura pode ser classificado, quanto à consistência, como sólido ou líquido. O meio sólido contém agentes solidificantes (ágar) e é utilizado para o isolamento. O meio líquido é utilizado para a manutenção das cepas e produção de biomassa para análises diversas. Em relação aos estudos taxonômicos, deve-se atentar para o meio utilizado no cultivo, pois a cepa pode apresentar morfometria distinta segundo a consistência ou/e composição do meio.

A utilização de diferentes meios de cultura em diferentes condições é motivada pelas distintas concentrações e tipos de nutrientes, o que propicia



as condições nutricionais adequadas específicas para alguns grupos de microrganismos.

Métodos

Os procedimentos foram realizados de acordo com os livros *Práticas de Microbiologia* (Vermelho *et al.*), *Manual de Cultivo de Cianobactérias* (Cybis *et al.*) e instruções dos orientadores. A escolha dos meios de cultura Sabouraud e MRS foi realizada de acordo com os microrganismos, fungos e bactérias (*Lactobacillus*), respectivamente, com os quais o grupo iria trabalhar e teve por base as indicações dos próprios fabricantes.

Lavagem de vidraria

A lavagem da vidraria, seja ela nova ou já de uso rotineiro do laboratório, deve obedecer à seguinte sequência:

- imersão em solução de cloro ativo com concentração entre 2 e 2,5% por 12 horas para desinfecção;
- lavagem manual com sabão não residual (Extran® ou similar) para remover os resquícios mais grosseiros, como material orgânico ou ágar aderido ao interior da vidraria;
- enxágue em água corrente até que todo sabão seja retirado;
- enxágue em água destilada, no mínimo três vezes, para remoção de possíveis sais deixados pelo sabão ou pela água da torneira;
- secagem em estufa a temperatura aproximada de 60°C;

- embalagem da vidraria com filme PVC transparente;
- estocagem das vidrarias devidamente embaladas em armários fechados.

Esterilização de vidraria

A vidraria previamente lavada deve ser esterilizada pouco antes do uso, a fim de se evitar contaminação. O processo de esterilização deve seguir os seguintes passos:

- vedação apropriada da vidraria: no caso de tubos de ensaio e Erlenmeyer, a vedação pode ser feita com rolhas de gaze e algodão ou com rolhas plásticas autoclaváveis; as placas de Petri devem ser envoltas em papel sulfite ou pardo e colocadas em sacos plásticos autoclaváveis;
- autoclavagem por 30 minutos a 125°C e pressão de 1,5 atm;
- secagem em estufa a temperatura de 60°C: nesse ponto, é importante averiguar se as rolhas de gaze e algodão e os papéis envoltos nas placas estão devidamente secos, para evitar que, futuramente, sejam colonizados por fungos.

Ressalta-se que toda vidraria autoclavada só deve ser aberta no momento do uso e dentro da câmara de fluxo laminar.

Preparo do meio de cultura

São preparadas as soluções (água destilada + meio) que compõem o meio de acordo com a concentração específica de cada um.

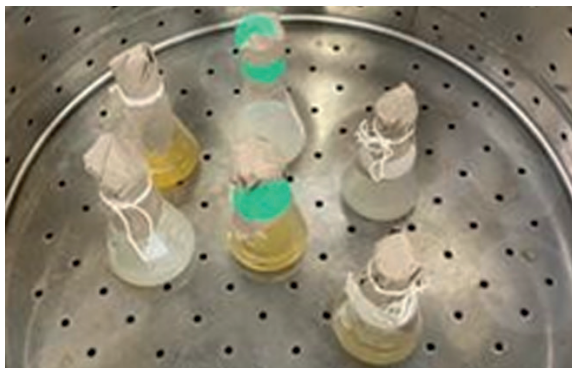


Figura 1 – Processo de esterilização dos meios de cultura em autoclave

Fonte: Os autores

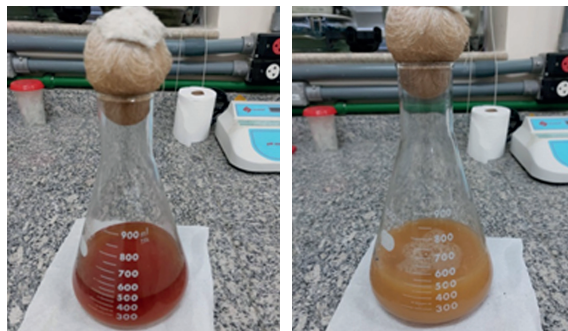


Figura 3 – Pós-autoclavagem do meio de cultura (a) meio MRS (b) meio Sabouraud

Fonte: Os autores

Resultados e análise

Os resultados obtidos com o trabalho foram satisfatórios e condizentes com as expectativas. Os meios de cultura foram feitos de forma assertiva de maneira que as tentativas de inoculação utilizando os meios preparados tiveram sucesso no crescimento dos respectivos microrganismos.

Durante o trabalho, os alunos envolvidos no projeto tiveram a oportunidade de aprender e vivenciar sobre o método científico e a sua aplicação prática dentro de um laboratório de microbiologia, completando assim o objetivo de promover o mundo da pesquisa para estudantes de nível médio.



Figura 2 – Meios de cultura antes da esterilização

Fonte: Os autores



Figura 4 – Placas de Petri inoculadas com bactérias (a) e (b) meio de cultura MRS

Fonte: Os autores

Conclusão

Dentro de um cenário em que o estímulo à pesquisa científica é precário, evidencia-se a importância de introduzir os jovens do ensino médio no mundo científico e estimular a imaginação em relação às suas possibilidades. Dessa forma, este trabalho desempenha um importante papel na iniciativa de reverter o quadro em que a sociedade e as escolas atualmente se encontram.

No projeto, a apresentação do mundo científico se dá por meio da biotecnologia, que, ao explorar as capacidades dos microrganismos para o bem da sociedade e compreender os processos



biológicos, demonstra seu impacto significativo. A biotecnologia se revela como uma ferramenta essencial para a solução de desafios contemporâneos, como se mostrou durante a pandemia de covid-19.

A pesquisa se dedicou a ressaltar a aplicação de técnicas básicas em um laboratório de biotecnologia, direcionadas de forma mais específica para o preparo de meios de cultura, uma etapa crucial no cultivo,

em ambiente controlado, de microrganismos. Os resultados obtidos foram satisfatórios ante as expectativas, e os meios de cultura produzidos foram inoculados, promoveram a proliferação de microrganismos desejados, além de permitir e estimular a experiência do método científico para jovens de nível médio.

Referências

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB**. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v. 2 n. 2, p. 236-245, 2004.

DE PAOLI, P. **Bio-banking in microbiology**: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiol Rev. 2005 Nov; 29(5): 897-910. doi: 10.1016/j.femsre.2005.01.005. Epub 2005 Feb 26. PMID: 16219511; PMCID: PMC7110355.

DE PAOLI, P. **Bio-banking in microbiology**: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiol Rev. 2005 Nov; 29(5):897-910. doi: 10.1016/j.femsre.2005.01.005. Epub 2005 Feb 26. PMID: 16219511; PMCID: PMC7110355.

MORET, K. E. L. *et al.* Caracterização de colônias de cepas comerciais de *Saccharomyces Cerevisiae* em meio de cultura ágar sabouraud dextrose. **Open Science Research XI**, p. 212-220, 2023.

SOLA, Marília Cristina; FEISTEL, Janaina Costa; OLIVEIRA, Aline Pedrosa de; REZENDE, Cíntia Silva Minafra e. **Manutenção de microrganismos**: conservação e viabilidade. Enciclopédia Biosfera, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1.398-1.418, jun 2012.

VERMELHO, Alane Beatriz *et al.* **Práticas de Microbiologia**. [S. l.]: Guanabara KOOGAN, 2006.

JACINAVICIUS, Fernanda; JUNIOR, Watson; AZEVEDO, Maria; ANNA, Celia. (2013). **Manual para cultivo de cianobactérias**.

