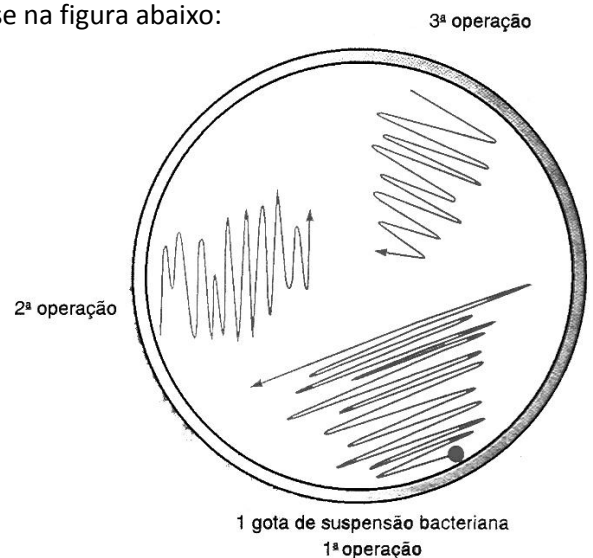


Aula Prática 06: ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS – TÉCNICAS DE SEMEADURA EM MEIO SÓLIDO

A. Técnica do esgotamento

- 1) Com uma caneta, divida em três partes triangulares iguais a base de uma placa de Petri contendo ágar BHI (placa 1) e de outra placa contendo ágar MacConkey (placa 2).
- 2) Esterilize a alça de inoculação e espere esfriar.
- 3) Flambe o tubo A.
- 4) Com a alça de inoculação, remova uma gota do meio líquido.
- 5) Flambe novamente o tubo e feche-o.
- 6) Semeie o inóculo sobre a superfície do meio sólido baseando-se na figura abaixo:

- A semeadura deve ser realizada em estrias, por meio de movimentos em zigue-zague em um terço da placa, iniciando da periferia em direção ao centro.
- A semeadura deve ser realizada com o maior número possível de estrias, sem perfurar ou rasgar o meio e sem sobrepor as estrias.
- Nos demais terços da placa, realize o mesmo processo de semeadura descrito anteriormente, cobrindo toda a região e sem tocar no terço já semeado.



- 7) Esterilize a alça de inoculação.
- 8) Repita o procedimento com a placa 2 (ágar MacConkey).
- 9) Incube as placas a 37 °C por 24 h.

B. Técnica das diluições em placa (diluições seriadas) e semeadura de espalhamento em superfície

- 1) Os microtubos sobre a bancada contêm 900 µL de solução salina estéril. Numere-os de 1 a 6.
- 2) Regule o volume de uma micropipeta automática para 100 µL e, com a micropipeta, retire uma ponteira do suporte, sem tocá-la.
- 3) Flambe o tubo B.
- 4) Introduza **somente a ponteira** no tubo, colete 100 µL do inóculo e feche o tubo.
- 5) Abra o microtubo 1 e coloque os 100 µL do inóculo. Misture bem a solução. Esta é a solução 1 (diluição 10^{-1}).
- 6) Dispense a ponteira no descarte contendo hipoclorito de sódio 3%.
- 7) A partir da solução 1, repita o procedimento dos itens “4 a 6” para obter as soluções 2 (diluição 10^{-2}), 3 (diluição 10^{-3}), 4 (diluição 10^{-4}), 5 (diluição 10^{-5}), e 6 (diluição 10^{-6}).
- 8) Nomeie 6 placas de 1 a 6, sendo cada uma para uma das soluções.
- 9) Nomeie outra placa como “Tubo B”.
- 10) Semeie 50 µL de cada diluição e também do meio inicial do tubo B em sua respectiva placa, conforme descrito abaixo:
 - Mergulhe a espátula de Drigalski em álcool 70%, esterilize-a e espere esfriar.
 - Misture bem o conteúdo de cada microtubo e retire 50 µL da diluição.
 - Espalhe o inóculo homogeneamente sobre o meio de cultura.
 - Novamente, mergulhe a espátula de Drigalski em álcool 70% e esterilize-a.
- 11) Incube as placas a 37 °C por 18 h.

C. Técnica de isolamento em meio seletivo-diferencial

- 1) Nomeie as placas com meio EMB de 1 a 3.
- 2) Esterilize a alça de inoculação e espere esfriar.
- 3) Flambe o tubo B e, com a alça, remova uma gota do meio líquido.
- 4) Flambe novamente o tubo e feche-o.
- 5) Na placa 1, realize a semeadura em estrias (conforme descrito no item A).
- 6) Repita os procedimentos de 2 a 5 para a suspensão do tubo C, semeando na placa 2.
- 7) Repita os procedimentos de 2 a 5 para a suspensão do tubo D, semeando na placa 3.
- 8) Incube as placas a 37 °C durante 18 h.

D. Questões

- 1) Descreva duas técnicas que podem ser empregadas para o isolamento de microrganismos em cultura pura. Qual é a importância de obterem-se colônias bacterianas isoladas?
- 2) *Clostridium tetani*, agente etiológico do tétano, é um bacilo anaeróbio obrigatório. Qual o procedimento para o cultivo de microrganismos anaeróbios?
- 3) A técnica do esgotamento foi suficiente para a análise de colônias isoladas? Ocorreu a formação de mais de um tipo de colônia?
- 4) Usualmente a diluição adequada para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) é aquela que permite o crescimento de 30 a 300 colônias. A partir de qual fator de diluição já foi possível realizar a contagem de UFC? Qual foi a melhor diluição obtida? Calcule o valor de UFC/mL da amostra original.
- 5) O meio EMB preparado funcionou como um meio seletivo-diferencial para os microrganismos plaqueados?