

Aula Prática 11: ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO AMBIENTE I

A. Isolamento de microrganismos de superfícies

- 1) Sobre a bancada, há 2 placas de meio TSA e 2 placas de meio Sabouraud (sendo, para cada meio de cultura, uma das placas do tipo Rodac e uma placa de Petri comum).
- 2) Escolha um ambiente para realizar a amostragem: tampa da privada, torneira, maçaneta, cartão USP, entrada do prédio, calçada, etc.
- 3) Carimbe as 2 placas Rodac (1: TSA e 2: Sabouraud) exatamente na mesma região.
- 4) Exponha as 2 placas de Petri comuns (1: TSA e 2: Sabouraud), com as tampas totalmente abertas, por 10 min, no **mesmo ambiente** das placas Rodac.
- 5) Incube as placa de TSA a 37 °C por 24 h, e a placas de Sabouraud a 25 °C durante 24 h - 48 h.
- 6) Descreva os resultados com relação à presença de colônias identificáveis de fungos e bactérias nas placas e à proporção das mesmas observada em cada placa.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura das placas Rodac

TSA	Composição por litro
Digestão pancreática de caseína	17 g
Digestão papáica de soja	3 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato dibásico de potássio	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Ágar	15 g
pH	7,3 ± 0,2 a 25 °C

Sabouraud	Composição por litro
Peptona micológica	10 g
Dextrose	40 g
Ágar	15 g
pH	5,6 ± 0,2 a 25 °C

MATERIAL JÁ PREVIAMENTE PREPARADO PARA OS ITENS B E C

- 1) 10 g de solo triturado foram misturados vigorosamente com 90 mL de água destilada por 5 min (Diluição 10⁻¹).

MATERIAL EM COMUM QUE DEVE SER PREPARADO PARA OS ITENS B E C

Sem deixar o solo decantar, realize as seguintes diluições: 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴:

- 2) Transfira 1 mL da diluição 10⁻¹ para um tubo contendo 9 mL de água destilada e misture bem (Diluição 10⁻²).
- 3) Transfira 1 mL da diluição 10⁻² para um tubo contendo 9 mL de água destilada e misture bem (Diluição 10⁻³).
- 4) Transfira 1 mL da diluição 10⁻³ para um tubo contendo 9 mL de água destilada e misture bem (Diluição 10⁻⁴).

B. Isolamento de fungos do solo

Utilize **somente as diluições 10^{-3} e 10^{-4}** para realizar dois tipos de semeadura: 1) Por espalhamento; e 2) Por profundidade.

B.1. Semeadura por espalhamento

- 5) Transfira 100 μ L da diluição para uma placa de Petri contendo meio de cultura para isolamento de fungos totais do solo.
- 6) Espalhe o inóculo homogeneamente em toda a superfície do meio sólido com a alça de Drigalski.
- 7) Incube as placas de Petri a 25 °C por 48 h.

B.2. Semeadura por profundidade

- 9) Transfira 100 μ L da diluição para uma placa de Petri vazia.
- 10) Adicione cerca de 20 mL de meio de cultura para isolamento geral de fungos liquefeito (cerca de 45 °C).
- 11) Tampe a placa e misture o conteúdo delicadamente movimentando a placa circularmente sobre a bancada.
- 12) Espere o ágar solidificar e incube as placas a 25 °C por 48 h.

13) Descreva os resultados e compare-os entre os dois métodos de semeadura utilizados.

Tabela 2. Composição do meio de cultura para isolamento de fungos totais do solo.

Componente	Composição por litro
Sacarose	30 g
Nitrato de sódio	2 g
Fosfato dibásico de potássio	1 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Sulfato de potássio	1 g
Sulfato ferroso	0,01 g
Ágar	18 g
pH	4,0 -4,5

C. Isolamento de actinomicetos do solo

Realize os mesmos procedimentos descritos no item B.1 para o item C, mas utilizando os dois meios de cultura para isolamento de actinomicetos do solo (ISP2 e ISP4).

Tabela 3. Composição do meio de cultura para isolamento de actinomicetos do solo.

ISP2	Composição por litro
Extrato de malte	10 g
Extrato de levedura	4 g
Glicose	4 g
Ágar	20 g
pH	7,3

ISP4	Composição por litro
Amido	10 g
Carbonato de cálcio	2 g
Sulfato de amônio	2 g
Fosfato dibásico de potássio	1 g
Sulfato de magnésio	1 g
Cloreto de sódio	1 g
Sulfato ferroso	1 mg
Cloreto de manganês	1 mg
Sulfato de zinco	1 mg
Ágar	20 g
pH	7,2

E. Questões

- 1) Para quais finalidades as placas Rodac são utilizadas?
- 2) Qual a importância de se estudar os actinomicetos do solo? Caracterize este grupo de microrganismos.