

Conteúdo

MEIOS DE CULTURA	1
Básicos.....	2
Especiais	2
Objetivos.....	2
APLICAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	2
Meios de pré-enriquecimento	2
Meios de Enriquecimento	2
Diferenciais	3
Seletivos	3
Meios de triagem	3
Identificação.....	3
Dosagem	3
Contagem	3
Estocagem ou manutenção	3
PREPARO DE MEIOS DE CULTURA	4
Caldo Simples - formulação:.....	4
Preparação	4
Ágar Simples.....	5
Função das substâncias do Ágar e Caldo simples	5

MEIOS DE CULTURA

Até cerca de 1880 os microrganismos eram cultivados em meios líquidos, quando Robert Koch e sua equipe introduziram os meios de cultura sólidos, os quais permitiram o estudo de espécies isoladas (culturas puras), separando-as de espécies contaminantes.

Meios de cultura consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural. Tendo em vista a ampla diversidade metabólica dos microrganismos, existem vários tipos de meios de cultura para satisfazerem as variadas exigências nutricionais. Além dos nutrientes é preciso fornecer condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos, tais como pH, pressão osmótica, umidade, temperatura, atmosfera (aeróbia, microaeróbia ou anaeróbia), dentre outras.

Os meios de cultura são classificados quanto ao **estado físico** em **sólidos**, quando contém agentes solidificantes, principalmente ágar (cerca de 1 a 2,0 %); **semi-sólidos**, quando a quantidade de ágar e ou gelatina é de 0,075 a 0,5 %, dando uma consistência intermediária, de modo a permitir o crescimento de microrganismos em tensões variadas de oxigênio ou a verificação da motilidade e também para conservação de culturas; e **líquidos**, sem agentes solidificantes, apresentando-se como um caldo, utilizados para ativação das culturas, repiques de microrganismos, provas bioquímicas, dentre outros.

Os meios de cultura podem ainda ser classificados quanto à **procedência dos constituintes** em **naturais** ou **complexos**, quando usa ingredientes com **composição química não definida**, tais como extratos de vegetais (malte, tomate, amido de tubérculos, peptona de soja, etc.) de animais (carne, cérebro, fígado, caseína, etc.) e de microrganismos (levedura) e **artificiais, sintéticos** ou ainda **quimicamente definidos** quando a **composição química é conhecida** (usados para trabalhos de pesquisa) e seus componentes servem para suprir as exigências nutritivas dos microrganismos, em fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas, energia, sais minerais, dentre outros, quando então são conhecidas as necessidades nutricionais específicas. Quanto à composição química podem ser simples (meios básicos) ou complexos.

Básicos

São aqueles que permitem o crescimento bacteriano, sem satisfazer, contudo **nenhuma exigência** em especial (Ex. caldo e ágar simples).

Especiais

Quando cumprem com as **exigências vitais** de determinados microrganismos, como meio de infusão de cérebro e coração, ágar suco de tomate, ágar sangue, meio de Loeffler (com soro bovino), ágar chocolate (ágar simples fundido, adicionado de sangue e aquecido a 80°C), Meio de Tarozzi (com fragmento de fígado - para anaeróbios), Meio de Lowenstein, meios Shahidi Ferguson Perfringens (SFP), Triptose Sulfito Ciclosserina (TSC), Baird-Parker (com gema de ovo) (meios ricos ou meios enriquecidos com as substâncias citadas), etc.

Objetivos

Esta parte trata de familiarizar o aluno com o preparo e esterilização de meios de cultura, bem como conhecer e discutir a aplicação dos diversos tipos de meios de cultura.

APLICAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

De acordo com a finalidade bacteriológica ou micológica os meios especiais podem ser classificados em:

Meios de pré-enriquecimento

São aqueles que permitem a dessensibilização de microrganismos injuriados, i.e., para amostras que sofreram algum tipo de tratamento (térmico ou químico). Ex. Água peptonada, caldo lactosado (isolamento de salmonelas de leite em pó).

Meios de Enriquecimento

Quando proporcionam nutrientes adequados ao crescimento de microrganismos presentes usualmente em baixos números ou de crescimento lento, bem como microrganismos exigentes e fastidiosos. Esses meios têm a propriedade de estimular o crescimento de

determinados microrganismos, mas existem alguns que também podem inibir o crescimento de outros. Ex. Caldo Tetrationato e Selenito-Cistina para cultivo de Salmonelas (líquidos), Caldo Tioglicolato para *Clostridium perfringens*.

Diferenciais

Quando contém substâncias que permitem estabelecer diferenças entre microrganismos muito parecidos, tais como meio de Teague ou Eosina Azul de Metileno (diferencial para coliformes), Ágar MacConkey para a diferenciação de enterobactérias, Ágar sangue, ágar Baird-Parker para isolamento e diferenciação de cocos Gram positivos (sólidos).

Seletivos

Os que contém substâncias que inibem o desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos, permitindo o crescimento de outros. Exemplo: meios com telurito de potássio (para isolamento de *Corynebacterium diphtheriae*), ágar Salmonella-Shigella (SS) e ágar MacConkey, meios com sais biliares e verde brilhante para isolamento seletivo de *Salmonella*, meios com 7,5% de cloreto de sódio, meio Baird-Parker, para isolamento de *Staphylococcus aureus*, meios com antibióticos para isolamento de diversos microrganismos (TSC, SFP, meio de Blaser, meio de Skirrow, etc.). A maioria deles é também diferencial, permitindo diferenciar as colônias (sólidos) dos microrganismos.

Meios de triagem

Meios que avaliam determinadas atividades metabólicas permitindo caracterização e identificação perfunctória ou presuntiva de muitos microrganismos (ágar tríplice açúcar e ferro, meio Instituto Adolfo Lutz, uréia, etc.);

Identificação

Presta-se para a realização de provas bioquímicas e verificação de funções fisiológicas de organismos submetidos à identificação (meios Oxidação/Fermentação, Ágar Citrato, Caldo nitrato, meio semi-sólido, caldo triptofano, meio de Sulfito Indol Motilidade, etc.);

Dosagem

Empregados nas determinações de vitaminas, antibióticos e aminoácidos;

Contagem

Empregados para a determinação quantitativa da população microbiana (Agar de Contagem em Placas, TSC, Agar Batata Dextrose, Ágar Baird-Parker, etc.);

Estocagem ou manutenção

Utilizados para conservação de microrganismos no laboratório, i.e. Garantem a viabilidade de microrganismos (Ágar Sabouraud, Meios com leite, Ágar suco de tomate, Ágar sangue, Ágar Simples, meio semi-sólido, etc.).

PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

Caldo Simples - formulação:

Extrato de carne... 0,3 g
Peptona... 1,0 g
Cloreto de sódio... 0,5 g
Água destilada... 100,0 ml

O ágar simples é obtido adicionando-se 1,0 a 1,5 % de ágar-ágar ao meio de caldo simples (o meio pode ficar um pouco amolecido, a depender da qualidade do ágar). Aumentando-se a concentração de ágar para 2,0% o meio fica bem sólido e se pode evitar que certos microrganismos se espalhem, como os *Proteus*.

Preparação

1. Pesar as substâncias e colocá-las em um béquer (a exceção do ágar)
2. Acrescentar a metade dos 100 ml de água destilada ou desmineralizada, medida com uma proveta
3. Dissolver os ingredientes em água agitando continuamente com um bastão de vidro ou com um agitador elétrico (uso de barra magnética), evitando a formação de espuma. Após a formação de uma suspensão homogênea, completar o volume do meio com o restante da água
4. Quando necessário, dissolver os ingredientes do meio de cultura em banho-maria, vapor fluente em autoclave ou utilizando a chama do bico de Bunsen, ou chapa aquecedora elétrica, protegida com tela de amianto, ou ainda em forno de microondas, até a ebulição, agitando sempre. Evitar o aquecimento desnecessário
5. Filtrar em papel de filtro qualitativo para retirar as impurezas
6. Verificar o pH através de potenciômetro ou fita indicadora de pH e ajustar para 7,2 usando solução de ácido láctico (0,1 %) ou hidróxido de sódio (1,0 N), com pipeta de 1 mililitro, gotejando aos poucos. O pH do "ágar simples" é ajustado antes da adição do ágar-ágar
7. Distribuir 50 ml do meio em tubos de ensaio (5 a 7 ml por tubo)
8. Tamponar os tubos, protegê-los com papel e amarrá-los com barbante
9. Esterilizar em autoclave a 121°C (1 atmosfera de pressão) por 20 minutos. Deixar dois tubos sem esterilizar, incubá-los a 37°C por 24 a 48 horas, para constatar a necessidade de esterilização.

Observação: Alguns meios de cultura são preparados da mesma forma, porém se for necessário utilizar algumas substâncias termolábeis (uréia) ou que reajam com as substâncias dos meios (aminoácidos, açúcares), as mesmas são esterilizadas à parte ou por filtração utilizando Filtro Seitz ou Filtros contendo membranas (de nitrocelulose ou acetato

de celulose) com poros de 0,22 μm de diâmetro (Millipore, Sartorius), e depois incorporadas, assepticamente, ao meio previamente esterilizado. Ainda, podem ser esterilizados por tinalização, também conhecida como esterilização fracionada (100°C por 1 hora por 3 dias consecutivos, intercalados por incubação entre 30 a 45°C), ou a 110°C por 10 a 15 minutos, a depender do tipo e carga microbiana.

Ágar Simples

1. Aos 50 ml de caldo simples restantes, acrescentar 0,5 a 1,0 g de ágar-ágar
2. Colocar o béquer sobre uma tela de amianto (ajustada num tripé metálico tendo por baixo o bico de Bunsen aceso)
3. Dissolver o ágar no meio, mexendo sempre com um bastão de vidro, para não aderir ao béquer, até a completa dissolução, evidenciada pela ausência de grânulos de ágar nas paredes do recipiente, tornando-se límpido. Isto somente se consegue com a ebulição do meio
4. Colocar em Erlenmeyer, tampar, proteger com papel e barbante
5. Esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos
6. Retirar do autoclave, esfriá-lo a 50-70°C e distribuir (cerca de 15 a 20 ml por cada placa) em placas de Petri (15 x 100mm) estéreis. Ou ainda, caso necessário, colocar em banho-maria a 45-55°C, adicionar 10 ml de sangue oxalatado de coelho ou de ovino (Ágar Sangue), e distribuir em placas de Petri estéreis. (previamente esterilizadas). Se antes da distribuição este meio for aquecido a 80°C até ficar de cor marrom, temos o Ágar chocolate.

Função das substâncias do Ágar e Caldo simples

Extrato de carne - Fonte de carbono orgânico, nitrogênio, vitaminas e sais minerais e, nesse caso de energia

Peptona - proteína semi-digerida que serve como fonte de nitrogênio

Cloreto de sódio - aumenta a pressão osmótica e mantém a isotonia do meio

Ágar-ágar - Sulfato de ácido poligalacturônico extraído de várias espécies de algas do gênero *Gellidium* e outras algas afins. Tem como função solidificar os meios e não é metabolizado por bactérias de interesse clínico.

Obs. 1. A adição de extrato de levedura (0,5%) e glicose (0,5 a 1,0 %) ao caldo simples enriquece o meio fornecendo vitamina B, fonte adicional de nitrogênio e carbono, e pode até permitir o crescimento de alguns microrganismos exigentes. 2. Os meios de cultura após esterilização devem ser incubados em condições ambientais (temperatura e atmosfera) adequadas para verificação da esterilidade (Prova da esterilidade). 3. A estocagem dos meios de cultura esterilizados e esfriados deve ser feita acondicionando-os invertidos, em sacos plásticos fechados, para reduzir a desidratação dos mesmos, colocando-os em refrigeração por, no máximo 15 dias.