

Unidade: 04

Preparo de meios de cultura

Monitoras: Amanda & Tainan

Capítulo 4 – Preparo de meios de cultura

O QUE BUSCAREMOS
APRENDER NESSE CAPÍTULO?



- I Conhecer a classificação dos meios de cultura.
- II Identificar as etapas de preparo dos meios de cultura.
- III Descrever os fatores que podem interferir na preparação dos meios de cultura.

Introdução

Importante

O cultivo dos micro-organismos em **condições laboratoriais** é pré-requisito para seu estudo adequado. Para que isso possa ser realizado é necessário o **conhecimento de suas exigências nutricionais e dos fatores físicos e/ou ambientais requeridos.**

Os meios de cultivo, também chamados meios de cultura são utilizados com o propósito de **fornecer as condições nutricionais mínimas para o cultivo artificial de micro-organismos.**

Devem conter todas as substâncias exigidas pelos micro-organismos para o seu **crescimento e multiplicação.**



Para que os micro-organismos possam fazer a síntese de sua própria matéria nutritiva devem dispor

- ✓ Fontes de carbono (proteínas, açúcares),
- ✓ Fontes de nitrogênio (peptonas) e
- ✓ outras Fontes de energia.

São também necessários alguns sais inorgânicos, vitaminas e outras substâncias favorecedoras do crescimento.

Certos micro-organismos crescem na maioria dos meios de culturas



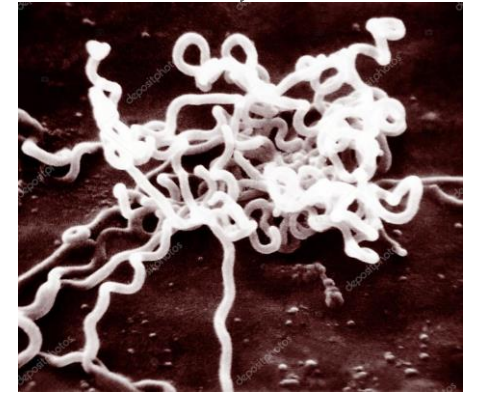
(como a *Escherichia coli*)

Certos micro-organismos necessitam de meios especiais, por isso são chamados de fastidiosos

(como as bactérias do gênero *Streptococcus* que necessitam de meios contendo sangue em sua composição)



Existem ainda aqueles que não são capazes de crescer em nenhum meio de cultura já desenvolvido



Treponema pallidum

Os meios de cultura devem ser utilizados para os seguintes propósitos:

- Promover o crescimento e isolamento de micro-organismos;
 - Pesquisar as características bioquímicas;
 - Conhecer as necessidades nutritivas;
 - Estudar as morfologias das colônias;
 - Pesquisar o perfil de susceptibilidade dos micro-organismos às drogas antimicrobianas.
-

Classificação dos meios de cultura

Os meios são classificados quanto à consistência, função, composição, natureza e pH.

Quanto à consistência

A consistência de um meio está diretamente relacionada com a presença e a **concentração de um agente solidificante**, como o ágar. Baseando-se nisso, os meios podem ser classificados como:

- **Líquidos: Não possuem agentes solidificantes em sua composição.** São utilizados principalmente para promover **crescimento da cultura, replicação da amostra, provas bioquímicas e estudos de fermentação.** Também são chamados de **caldo.** Ex.: Caldo Tioglicolato e BHI Caldo.
- **Semissólidos: Possuem baixa concentração de ágar,** em torno de 0,075% a 0,5%. Esse tipo de meio permite **verificar a motilidade dos micro-organismos, crescimento em tensões variadas de oxigênio ou estocagem.** Ex.: Meio SIM (sulfeto indol motilidade).
- **Sólidos: Possuem agente solidificante em uma concentração aproximada de 0,5% a 2% (ou mais comumente 15 g/L de ágar).** **A principal característica desse tipo de meio é permitir o isolamento dos micro-organismos presentes na amostra, além de possibilitar uma análise mais delicada da morfologia da colônia.** Ex: Ágar Batata Dextrose

O que é o ágar?

O ágar é um **hidrocolóide** extraído de algas marinhas vermelhas da classe Rhodophyta (*Ahnfeltia* spp., *Gracilaria* spp. e *Gelidium* spp.) largamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica. Dentre as suas principais propriedades, as temperaturas de fusão (94 °C) e solidificação (42 °C) são bem definidas. **Assim, o mesmo é adicionado ao meio de cultura líquido para torná-lo sólido.** Salienta-se que o ágar é apenas um agente solidificante, nunca sendo adicionado ao meio de cultura como nutriente, pois, em geral, não consegue ser utilizado pelos micro-organismos.



Gracilaria spp

O ágar possui propriedades muito importantes para microbiologia. Pois poucos microrganismos conseguem degradar o ágar, e, portanto ele permanece sólido quando é adicionado ao meio de cultura (material nutriente que é usado para o crescimento de microrganismos em laboratório).

Cultura ágar sangue



Por conta da sua alta concentração de carboidratos e composição química rica em nutrientes, o ágar sangue é um [tipo de meio de cultura](#) excelente para o desenvolvimento de diversos tipos de fungos, filamentosos e colônias leveduriformes. Seu aspecto gelatinoso possibilita uma fácil e segura manipulação dentro do laboratório.

De modo geral, o [meio de cultura na forma ágar](#) sangue é usado para a criação de meios diferenciais e seletivos. No primeiro caso, ele possibilita o estabelecimento distinto entre microrganismos bastante semelhantes. Já no meio seletivo de cultura, o ágar sangue pode ser aplicado em determinados grupos de microrganismos, impossibilitando o crescimento de outros no mesmo espaço, elegendo um cenário para análise e estudo.

é comumente usado em laboratórios de análises clínicas, como a produção primária para a separação de *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp*.

Cultura ágar chocolate



O Agar Chocolate é indicado para cultivo de microrganismos fastidiosos. Sua base é rica em nutrientes, suplementado com hemácias de carneiro lisada e vitaminas do complexo B. Que proporcionam o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos de interesse clínico.

Quanto à função

Os meios podem ser utilizados com diversos propósitos, como por exemplo, promover o crescimento e/ou o isolamento dos micro-organismos, conhecer as necessidades nutritivas dos mesmos, pesquisar características bioquímicas e o perfil de susceptibilidade a antibióticos, entre outros.

- **Seletivos:** Favorecem o crescimento do organismo de interesse impedindo o crescimento de outros micro-organismos. Ex.: ágar MacConkey.
 - **Diferenciais:** Possibilitam identificar a presença dos micro-organismos de interesse, pois provoca reações características nos mesmos, funcionando, assim, como meios de identificação presuntiva. O ágar sangue, por exemplo, é frequentemente utilizado para a identificação de bactérias com padrões hemolíticos (que destroem células sanguíneas pela ação de hemolisinas), como *Streptococcus pyogenes*.
-

Quanto à função

Transporte: servem para o transporte de uma dada amostra biológica que se deseja isolar micro-organismos. São importantes por manterem a viabilidade das amostras, porém evitam que haja multiplicação de micro-organismos durante aproximadamente 72 horas. O meio de Stuart é um exemplo clássico, muito usado por laboratórios de análise microbiológica.

- **Enriquecimento: Utilizados quando o microrganismo de interesse está em baixo número na amostra, estimulando o crescimento dos mesmos e possibilitando sua detecção.** Outra função desses meios é a de **nutrir organismos fastidiosos**, ou ainda recuperar uma cepa, promovendo seu rápido crescimento. Geralmente são meios basais adicionados de produtos biológicos ricos em nutrientes, como soro, sangue ou ovo. São exemplos os meios BHI (infusão de cérebro e coração), ágar sangue e ágar chocolate.
- **Redutores: Utilizados no cultivo de micro-organismos anaeróbicos**, contêm substâncias em sua composição que são capazes de reagir com oxigênio dissolvido no mesmo e eliminá-lo. Um dos reagentes utilizados para esse fim é o tioglicolato de sódio.

Quanto à composição

- **Sintético ou Quimicamente definido:** é quando sua composição e concentração de cada um dos seus componentes é conhecida. São compostos por produtos químicos bem definidos, e quando dissolvidos em água destilada, formam uma solução nutritiva devidamente tamponada.
 - **Complexo:** a composição química pode conter variações, sendo compostos por uma variedade de substâncias de origem animal (carne, peptona, bile bovina), vegetal (ceras, extratos vegetais) ou microbiana (extrato de levedura). São exemplos o ágar Lactrimel e ágar BHI.
-

Quanto à natureza

- **Animados:** São constituídos de **células vivas**, como, por exemplo, tecidos ou ovos embrionários.
- **Inanimados:** Possuem apenas **moléculas inorgânicas em sua composição**, podendo ser classificados como **naturais**, ou seja, constituídos por **substâncias provenientes da natureza**, ou **sintéticos**, quando formado por **substâncias químicas** — produzidas em laboratório.

Quanto ao pH

- **Tamponado:** Para que não haja variação de pH, em consequência da eliminação de metabólitos ao meio, alguns meios são acrescidos de tampões. Um exemplo é o meio RPMI, que ao ser preparado apresenta pH em torno de 7,9, sendo tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino propano sulfônico)], para atingir pH 7.
- **Não tamponado:** Não são acrescidos de tampões, embora alguns constituintes como a peptona e os aminoácidos possam funcionar como tais

Preparo de meio de cultura

A maioria dos meios de cultura usada num laboratório de Microbiologia é disponível em forma de **pós desidratados**, os quais contêm todos os componentes desejados, sendo necessário **somente a adição de água para posterior esterilização**.

Os meios de cultura estão constantemente sendo desenvolvidos ou atualizados visando **otimizar e facilitar a identificação dos micro-organismos**.

Os meios de cultura são preparados e armazenados seguindo rigoroso controle de qualidade

Preparo de meio de cultura

Entretanto, para que sejam mantidas todas as suas propriedades nutricionais, garantida a esterilidade até o momento de sua utilização e o crescimento dos micro-organismos desejados, é necessário proceder cada etapa de seu preparo criteriosamente

as etapas do preparo
do meio de cultura
desidratado

- Pesagem do pó, geralmente orientada pelo próprio fabricante e condicionada à quantidade final de meio necessária;
- Diluição do pó em quantidade adequada de água destilada;
- Distribuição em tubos ou placas para posterior autoclavação ou realiza-se a autoclavação em uma outra vidraria, como um Erlenmeyer, e então, procede-se à distribuição em tubos ou placas previamente esterilizados;
- Análise e possível correção do pH;
- Distribuição do meio em tubos ou placas, caso este não tenha sido autoclavado nos mesmos.
- Armazenamento do meio em condições adequadas que permitam a manutenção das suas propriedades nutricionais e a garantia da sua esterilidade até o momento da utilização.

Inoculando um micro-organismo em um meio de cultura que possua todos os requisitos nutritivos necessários e fatores ambientais favorecidos o microrganismo inicia seu desenvolvimento neste meio, passando pelas diversas fases da curva de crescimento, desde a fase de latência, logarítmica, estacionária, até a fase da morte

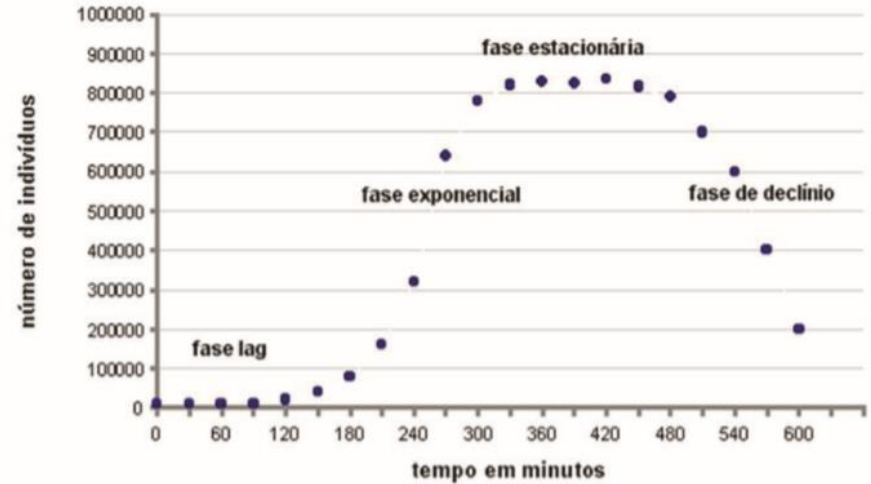


Figura 1 – Padrão típico de crescimento de uma cultura bacteriana em um sistema fechado.

Fonte: www.ucq.br