

## **MEIOS DE CULTURA**

No Laboratório de Microbiologia o principal objetivo das análises realizadas é a avaliação do crescimento, isolamento e comportamento bioquímico das espécies de microorganismos pesquisados. Por tanto é de grande importância que se proporcione um ambiente adequado e favorável ao seu desenvolvimento, oferecendo-lhes os nutrientes adequados e em concentrações suficientes ao seu metabolismo.

Sendo este ambiente, alcançado com um conjunto de substâncias formuladas de maneira adequada e capaz de promover o crescimento bacteriano em condições de laboratório com monitoramento e regulação das condições físicas de pH, osmolaridade, umidade, aeração e temperatura.

Estes meios são preparados a partir de substâncias básicas que lhe conferem algumas características especiais, dentre elas diferentes estados físicos.

- 1 **Líquidos ou Caldos:** (Sem adição de Agar)
- 2 **Sólidos:** (Agar 1,0 a 1,5%)
- 3 **Semi-sólido:** (Agar 0,5%)

### **Prática 1 – Preparo dos meios.**

- **Grupo A - Agar Sal Manitol (7,5):**

Características; seletivo para crescimento de estafilococos patogênicos em amostras clínicas e alimentos. Composição em g/L:

- 10,0g Peptona de carne;
- 1,0g Extrato de carne;
- 75,0g Cloreto de sódio;
- 10,0g Manitol;
- 0,025g Azul de fenol;
- 12,0g Agar;
- Ajuste de pH final – **7,5**;
- Cor: rósea pálido;
- Consistência sólida 1,3% de Agar.

Preparo:

- Dissolver 111,0g do pó desidratado em 1.000ml de água destilada, deixar hidratar por 15'min. E ferver por 1'min. ou até dissolver por completo. Levar a autoclave para esterilização à 15lbs de pressão, 121°C por 15'min. deixar esfriar e distribuir 20ml em placas de petri estéril. Se necessário estocar por longos períodos, autoclavar em tubos alíquotas de 20ml que poderão ser aquecidas novamente na hora de uso para confecção das placas.

**OBS.:** Preparar quantidade suficiente para (qsp) 100ml.

- **Grupo B – Agar Mueller Hinton:**

Características; ideal para determinação da susceptibilidade dos microorganismos à agentes antimicrobianos e usado como base para formulação de Agar sangue e Agar chocolate.

Composição em g/L:

- 300g Infusão de carne;
- 17,5g Caseína Ácida Hidrolisada;
- 1,5g Amido;

- 17,0g Agar;
- Ajuste de pH final – 7,3;
- Cor: Amarelo claro levemente opaco;
- Consistência sólida 1,7% de Agar.

Preparo:

- Dissolver 38,0g do pó desidratado em 1.000ml de água destilada, deixar hidratar por 15'min. E ferver por 1'min. ou até dissolver por completo. Levar a autoclave para esterilização à 15lbs de pressão, 121°C por 15'min. deixar esfriar e distribuir 20ml em placas de petri esteril. Se necessário estocar por longos períodos, autoclavar em tubos alíquotas de 20ml que poderão ser aquecidas novamente na hora de uso para confecção das placas.

**OBS.:** Preparar quantidade suficiente para (qsp) 200ml.

**- Como base para Agar sangue:**

Preparo:

- Deixar o Agar Mueller Hinton esfriar após a esterilização e atingir temperatura entre 50 a 45°C adicionar 5% de sangue desfibrinado de carneiro misturar e distribuir nas placas de petri.

Ajuste de pH final – 6,8.

**- Como base para Ágar chocolate:**

Preparo:

- Com o Ágar Mueller Hinton à temperatura entre 80°C após a esterilização adicionar 5% de sangue desfibrinado de carneiro misturar e distribuir nas placas de petri.

Ajuste de pH final – 7,2.

- **Grupo C - Agar Eosina Azul de Metileno (EMB ou TEAGUE):**

Características; seletivo para o crescimento e isolamento de enterobactérias patogênicas em amostras clínicas e alimentos.

Composição em g/L:

- 10,0g Peptona de carne;
- 5,0g Sacarose;
- 5,0g Lactose;
- 2,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;
- 0,4g Eosina;
- 13,5g Agar;
- Ajuste de pH final – 7,1;
- Cor: Violeta escuro;
- Consistência sólida 1,4% de Agar.

Preparo:

- Dissolver 36,0g do pó desidratado em 1.000ml de água destilada, deixar hidratar por 15'min. E ferver por 1'min. ou até dissolver por completo. Levar a autoclave para esterilização à 15lbs de pressão, 121°C por 15'min. deixar esfriar e distribuir 20ml em placas de petri esteril. Se necessário estocar por longos períodos, autoclavar em tubos alíquotas de 20ml que poderão ser aquecidas novamente na hora de uso para confecção das placas.

**OBS.:** Preparar quantidade suficiente para (qsp) 100ml.

- **Grupo D – Caldo tioglicolato:**

Características; seletivo para crescimento de microorganismos anaeróbios estritos, facultativos e microaerófilos em amostras clínicas e alimentos, para testes de esterilidade e transporte.

Composição em g/L:

- 15,0g Peptona de carne;
- 5,0g Extrato de levedura;
- 5,5g glicose;
- 2,5g Cloreto de sódio;
- 0,5g Cisteína;
- 0,5g Tioglicolato de Sódio;
- Ajuste de pH final – 7,1;
- Cor: Amarelo pálido à rósea pálido de aspecto límpido;
- Consistência líquida, 0,0% de Ágar.

Preparo:

- Dissolver 28,5g do pó desidratado em 1.000ml de água destilada, deixar hidratar por 15'min. E ferver por 1'min. ou até dissolver por completo, distribuir em tubos alíquotas de 20ml e levar a autoclave para esterilização à 15lbs de pressão, 121°C por 15'min.

**OBS.:** Preparar quantidade suficiente para (qsp) 60ml.

- **Grupo E – Ágar SS**

Salmonella Shigella Agar (SS Agar) é um meio diferencial seletivo utilizado no isolamento de bacilos entéricos patogênicos, especialmente os que pertencem ao gênero Salmonella e/ou Shigella, provenientes de amostras clínicas e alimentos.

Composição em g/L:

- 5,0g Extrato de carne;
- 2,5g Hidrolisado pancreático de caseína;
- 2,5g Hidrolisado péptico de tecido animal;
- 10g Lactose;
- 8,5g Sais biliares;
- 8,5g Citrato de sódio;
- 8,5g Tiosulfato de sódio;
- 1,0g Citrato férrico;
- 0,025g Vermelho neutro;
- 13,5g Ágar;
- 0,33mg Brilliant Green;
- Ajuste de pH final – 7,2;
- Cor: Vermelho claro à rósea;
- Consistência sólida, 1,3% de Ágar.

Preparo:

- Dissolver 60g em 1 litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos. aquecer agitando frequentemente e ferver no máximo 1 minuto. O meio não deve ser autoclavado. Esfriar até 45-50°C. Distribuir 15-20 mL por placa de Petri estéril. Se não for usado no mesmo

dia, armazenar entre 2 e 8°C em posição invertida.

### 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. 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).
3. Os meios de cultura após esterilização devem ser incubados em condições ambientais (temperatura e atmosfera) adequadas para verificação da esterilidade (Prova da esterilidade).
4. 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.

### Caldo Simples - formulação:

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

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.

### ESTERILIZAÇÃO

Para o bom funcionamento de um laboratório de microbiologia se faz necessário um rigoroso controle que vai desde a limpeza geral de pisos e bancadas à uma criteriosa esterilização das vidrarias e de todo material (meios cultura) utilizados para realização dos exames microbiológicos.

### **Prática 2 – Esterilização dos meios.**

#### Procedimento:

- Embalar os balões ou tubos contendo os meios de cultura preparados na prática 1, lacrar as embalagens com fita adesiva;
- Levar a autoclave conferir o nível de água antes de liga-lo, fechar a tampa superior, abrir completamente a válvula de pressão;
- Ligar e ao observar elevação de temperatura fechar a válvula para que haja aumento também da pressão;
- Observar a temperatura até atingir 121°C manter por 15'min., desligar e aguardar a redução da pressão e temperatura para retirada do material autoclavado.

- Ao esfriar, retirar os meios desembalá-los e acondicionar os tubos em geladeira à temperatura entre 2 – 8°C, e utilizar o material dos balões para o preparo das placas que não poderão ser armazenadas por período maior que 15 dias.

### **Aplicação da Esterilização**

A esterilização é um processo de eliminação completa de microorganismos que emprega método

#### **Métodos de esterilização mais utilizados no laboratório de microbiologia.**

O calor é o principal método de esterilização utilizado em Microbiologia, podendo ser seco ou úmido.

#### **O calor seco é utilizado em:**

- 1 Incineração: para a esterilização de alças de metal, durante o repique de culturas bacterianas;
- 2 Flambagem: utilizada para fixar lâminas de microscópicos molhados com álcool metilado;
- 3 Fornos com ar quente: 160°C por 60 minutos para bisturis, tesouras e substâncias impermeáveis ao calor úmido (óleo, cera);
- 4 Radiação infravermelha: raramente é utilizada hoje em dia.

#### **O calor úmido é alcançado por meio de:**

- 1 Fervura em água por 5, 10 ou 20 minutos destrói as células vegetativas, mas não necessariamente todos os esporos, portanto, não indicado para esterilização.
- 2 **Autoclavagem** é o processo de esterilização que combina calor úmido com pressão, sendo considerado o mais seguro e eficiente.

Em bacteriologia a autoclave é utilizada na esterilização de material usado na preparação de meios de cultura e esterilização em geral.

A autoclave é uma caldeira, construída por um tubo cilíndrico e fechada hermeticamente com tampa de cobre ou bronze, fixada por vários parafusos, munida superiormente por uma válvula de segurança, um manômetro para registro de pressão e uma torneira de escape do vapor d'água aquecida.

Dentro da autoclave existe um cesto de metal para acondicionamento do material, deixando um espaço entre o fundo do aparelho e a sua parte inferior, reservado para conter água e as resistências de aquecimento. Externamente há um interruptor indicando a potência mínima, média e máxima de aquecimento, quando ligada uma ou as duas resistências elétricas.

A autoclavagem depende do vapor d'água sob pressão e, por isto, a temperatura é superior a 100°C (p.ex., 121°C por 15 minutos ou 132°C por 3 minutos). Estas combinações de tempo e temperatura têm sido escolhidas porque os experimentos mostram que destroem esporos de clostrídios e outros esporos patogênicos mais resistentes a outros processos de esterilização.

O uso da autoclave confere muita eficiência ao processo de esterilização, realizado através da desnaturação protéica. No entanto, requer também bastante preparo de quem o manuseia. Os cuidados têm início com a limpeza e secagem do material a ser esterilizado. Ele deve ser acondicionado em pacotes, tambores, caixas metálicas com furos e vidros com tampão de algodão ou papel. Devem ser acomodados adequadamente, sem compactação.

#### **As recomendações do Ministério da Saúde para a esterilização com autoclaves:**

1. obediência à indicação do fabricante com manutenção preventiva, no mínimo semanal;
2. conhecimento e prática da distribuição dos pacotes em relação à posição dos mesmos e ao tipo de material submetido ao processo;
3. para invólucros o uso de tecido de algodão cru, embalagem de papel kraft ou de papel grau cirúrgico;
4. a monitorização deve ser realizada por testes biológicos semanais;

5. identificação visual dos pacotes com fita termossensível, para assegurar que o pacote passou pelo calor;
6. registro de controles de pressão interna e externa das câmaras, da pressão negativa e temperaturas a cada ciclo de esterilização.

### **Referências Bibliográficas:**

**BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 15, de 15 de março de 2012.** Dispõe sobre requisitos de boas práticas para serviços de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 mar. 2012.

**CLEAN, H. D.; WILLIAMS, J. E.** Sterilization. In: MAHA, C. R.; COLLINS, C. H. (ed.). **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 4th ed. Oxford: Blackwell Science, 2006. cap. 12, p. 529-554.

**FORBES, B. A.; SAHIM, D. F.; WEISSFELD, A. S.** **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 14th ed. St. Louis: Elsevier, 2020.

**JAMES, G.; CAPPUCCINO, J.; SHERMAN, N.** **Microbiologia: laboratório**. 9. ed. Porto Alegre: AMGH, 2021.

**KONEMAN, E. W. et al.** **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2017.

**SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.** **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

**TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.** **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

### **Roteiro prático para Preparo e Esterilização de Meios de Cultura**

**Prof. Juliano Gomes Barreto**

**Doutorando em Ciências Farmacêuticas**

**MSC em Ensino de Ciências da Saúde e do Ambiente**

**Especialista em Análises Clínicas**

**Universidade Iguazu – Campus V Itaperuna**

**Curso de Farmácia**