



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS – PUC Goiás
ESCOLA DE ENGENHARIA
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Aula nº 6- Preparo e Esterilização de Meios de Cultura

Introdução

O estudo dos microrganismos, sua identificação e a avaliação de suas populações nos diferentes materiais e ambientes requerem seu cultivo em condições de laboratório.

Chama-se meio de cultura a um substrato ou uma solução nutriente nos quais os microrganismos são cultiváveis em laboratório. E dá-se o nome de cultura a qualquer crescimento ou cultivo de microrganismo.

Os meios de cultura são constituídos de mistura de substâncias naturais ou sintéticas qualitativa e quantitativamente equilibrada que permitem o crescimento de microrganismos fora do seu habitat natural.

Os primeiros meios para cultivo artificial de microrganismos eram líquidos como caldo de pimenta, urina, infusão de carne, e mais tarde a gelatina passou a ser utilizada para cultivo em meios sólidos. Atualmente, os meios de cultura são muito diversificados e podem ser obtidos comercialmente ou preparados em laboratórios a partir de ingredientes básicos.

Classificação dos meios de Cultura

1) Quanto ao estado físico

. Meios líquidos: São meios na forma de caldos, importantes para obtenção de maior massa celular em menor tempo. O crescimento bacteriano é verificado através da turvação. É utilizado para obter um crescimento microbiano maior e mais rápido em testes de fermentação, etc.

. Meios sólidos: São meios adicionados de uma substância que promove a solidificação do mesmo. Utiliza-se agente solidificante, ágar-ágar, que é um polissacarídeo extraído de algas marinhas do gênero *Gellidium*. Possui ponto de fusão \Rightarrow 98 °C e ponto de solidificação = 40-45 °C. O ágar não é hidrolisado pela maioria dos microrganismos. É

usado na proporção de 1,5%, sendo utilizado para isolamento de culturas puras, estudo das características culturais (morfologia de colônias, etc.), estocagem de culturas puras (ágar inclinado) e contagem de bactérias e certos fungos em placas;

.Meios semi-sólidos: é usada uma menor porcentagem de ágar (0,5-0,6%). É utilizado para observação de colônias de microrganismos móveis ou para caracterização de microrganismos microaerófilos.

2) Quanto a origem ou natureza dos constituintes

. Naturais: quando os constituintes são substâncias naturais e não é possível conhecer a composição exata do meio. Como já mencionado anteriormente, como caldo de pimenta, urina, infusão de carne, sangue, leite, caldo de frutas, caldo de cana, entre outros.

. Sintéticos: quando a composição do meio é conhecida qualitativa e quantitativamente. Ex.: Meio mínimo: K_2HPO_47g, KH_2PO_42g, $MgSO_4.7H_2O$ (10%)....1mL e $(NH_4)_2SO_4$1g.

. Meios semi-sintéticos: quando é possível conhecer parte da composição química do meio. Ex.: Meio mínimo + extrato de carne.

Para que as bactérias possam crescer e multiplicar nos meios de cultura é necessário que disponham de uma fonte de carbono e uma de nitrogênio. Assim elas podem efetuar a síntese de sua própria matéria orgânica. Mas, além das duas fontes mencionadas incorpora-se ao meio de cultura, os chamados fatores de crescimento, representados por certos aminoácidos (triptofano, cistina, etc) e certas vitaminas (complexo B). Estas e outras substâncias extras celulares que penetram na célula através de sua membrana e são usadas pelos microrganismos para a obtenção de energia e construção de seu “esqueleto”. A depender do tipo de microrganismo podem ser ou não adicionados outros componentes como sangue e extratos vegetais.

3) Quanto a finalidade

Os meios de cultura podem ser utilizados com propósitos especiais para facilitar a identificação, a enumeração e o isolamento de certos tipos de microrganismos. Assim uma outra classificação dos meios de cultura pode ser feita considerando sua aplicação ou função.

- Meios gerais ou básicos: são meios que permitem o crescimento de um grande número de espécies microbianas dentro um grupo, como por exemplo o ágar nutriente e o PCA (*Plate Count Agar*) para bactérias de forma geral e ágar Sabouraud e ágar batata dextrose (BDA) para fungos.

- Meios de enriquecimento: Meios adicionados de componentes (sangue, extrato de plantas, etc.) que fornecem nutrientes adicionais que permitem o crescimento de microrganismos nutricionalmente mais exigentes (fastidiosos). Como exemplo tem-se o ágar sangue para isolamento e cultivo de bactérias dos gêneros *Neisseria*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

- Meios seletivos: Meios adicionados de substâncias específicas que previnem o crescimento de um grupo de microrganismos sem inibir outros. Por exemplo ágar Eosina azul de metileno (EMB), que é seletivo para enterobactérias, com a *Escherichia coli* apresentando colônias pequenas, com centro escuro e bordas verde metálicas.

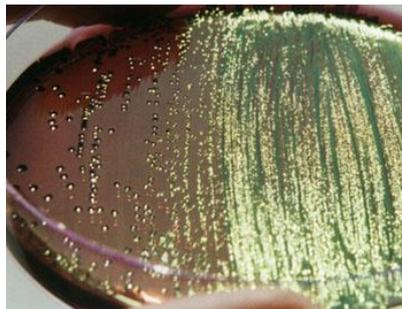


Figura 1- Ágar EMB, mostrando o crescimento de *E.coli*.

Fonte: microbiologyusp.wikia.com

- Meios Diferenciais ou Indicadores: Meios que permitem, mediante a adição de reagentes verificar comportamento diferente dos tipos de bactérias. Ex.: Meio com indicador de púrpura de bromocresol que fica amarelo se a bactéria produz ácido e roxo se não produz e ágar Rambach para diferenciação entre *Salmonella* de outras enterobactérias como *Escherichia* e *Klebsiella*.

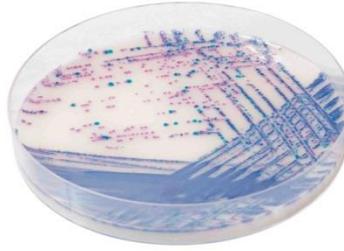


Figura 1- Ágar Rambach, mostrando o crescimento de dois grupos microbianos

Fonte: Cromagar.com

- Meios de estocagem, conservação ou manutenção: Meios para manter e preservar a viabilidade dos microrganismos por tempos mais prolongados.

O meio de cultura deve conter os elementos necessários para o crescimento do microrganismo em estudo e, uma vez que o requerimento nutricional das bactérias varia desde simples substâncias orgânicas até vitaminas, aminoácidos e outros, nem sempre é possível formular um meio ideal para cada microrganismo. Portanto, usa-se comumente um meio que permite o crescimento de grande variedade de microrganismo. Para cultivo de bactérias, o meio mais usado é o caldo nutriente e ágar nutriente. Porém em uma análise de alimentos, meios seletivos e diferenciais são preferidos.

Exemplos:

Caldo Nutriente	Ágar Nutriente
Extrato de carne.....3g	Extrato de carne.....3g
Peptona.....5g	Peptona.....5g
Água destilada.....1L	Água destilada.....1L
	Ágar-ágar.....15g
pH ajustado para 6,8-7,0	

O extrato de carne contém substâncias solúveis do tecido animal e é fonte de carboidratos, compostos orgânicos nitrogenados, vitaminas e sais. A peptona é resultado da digestão de materiais protéicos e é a principal fonte de nitrogênio orgânico.

O extrato de leveduras é muito usado em meios de cultura, é uma fonte em vitaminas do complexo B.

Os meios de cultura para a maioria das bactérias, não contém mais que 1% de açúcar e 0,85% de sal, entre 3-4% de açúcar e 1-2% de NaCl, já inibem o crescimento de muitas bactérias.

Após a mistura dos ingredientes e ajuste do pH os meios são distribuídos em tubos ou Erlemeyers, devidamente tampados (tampões de algodão, metálicos ou de rosca) e então esterilizados.

Com a introdução de meios desidratados, tornou-se possível uma grande economia de tempo no preparo de meios, evitando a pesagem dos compostos em separado. No entanto, os meios desidratados são em geral higroscópicos, e devem ser conservados em lugar seco, protegidos contra a luz, em recipientes sempre bem fechados. Não deixar aberta a embalagem do meio de cultura, mais do que o tempo necessário.

ESTERILIZAÇÃO

Vários procedimentos de esterilização são usados para destruir microrganismos. A escolha do método depende principalmente de natureza do material a ser esterilizado.

O objetivo da esterilização é destruir ou remover todos os organismos patogênicos ou não, incluindo os esporos bacterianos. As bactérias nas suas formas vegetativas, são destruídas com certa facilidade pelos métodos comuns de esterilização. O mesmo comportamento é observado para as células vegetativas e esporos de leveduras e bolores. Os esporos bacterianos, no entanto, constituem um grupo de organismos que apresentam a maior resistência a ação dos agentes físicos, especialmente, a temperatura. A maioria dos esporos bacterianos exige, para a sua eliminação, temperaturas superiores a 100 °C por período de tempo prolongado. A relação temperatura e tempo de exposição que deve ser usada para tornar um material estéril é baseado no grau de resistência ao calor dos esporos bacterianos.

Processos de Esterilização:

- Calor úmido
- Calor seco
- Irradiações
- Substâncias químicas
- Filtração

. Calor Úmido: - água fervente, esterilização pelo vapor d'água e vapor d'água sob pressão > 100 °C.

- Água fervente: a água em ebulição mata organismos (bactérias na forma vegetativa) pela coagulação das proteínas. Não destrói esporos prontamente. Este método é raramente usado em trabalhos de laboratório, sendo praticamente restrito ao uso doméstico.

- Esterilização pelo vapor d'água: conhecido como vapor fluente. Este método é usado para esterilizar meios ou substância termolábeis. Uma maneira de se conseguir vapor fluente de modo prático é através da autoclave aberta. O material é colocado na autoclave recebendo vapor fluente por 30 a 60 minutos durante 3 dias consecutivos. No 1º dia as células vegetativas são mortas; os esporos interrompem o período de latência, germinam e as células vegetativas são destruídas no 2º dia. O 3º dia de exposição ao vapor fluente, destrói os organismos que sobrevivem das duas exposições (Tindalização);

- Vapor d'água sob pressão: permite obter temperaturas de vapor d'água em torno de 121 °C (15 libras de pressão) e uma esterilização eficiente num tempo de 15 a 30 minutos, dependendo do material. É um processo mais eficiente que o calor seco, porque a água tem maior condutibilidade térmica que o ar.

. Calor Seco: A esterilização pelo calor seco em estufas requer altas temperaturas e período de aquecimento maior que na esterilização pelo calor úmido. É usada para esterilização de vidraria seca (placa de Petri, tubo de ensaio, etc.), solo, alguns óleos, etc. As temperaturas variam de 160 a 180 °C por 1 a 2 horas. Também inclui nesta esterilização, calor ao rubro, utilizado para esterilizar alças e agulhas inoculadoras, as quais são esterilizadas mantendo-as expostas à chama do bico de Bunsen. Em ambos os casos, os microrganismos são inativados pela oxidação dos componentes celulares.

. Irradiações: O material a ser esterilizado é submetido à ação de radiações ionizantes (raios X, δ) ou ultravioleta. Radiações U.V. são usadas para esterilização de ambientes e superfícies, por causa do seu baixo poder de penetração. Ex. Esterilização de câmaras de repicagens ou de maturação de queijos, salas de cirurgias, interior de embalagens para alimentos, como o saco plástico para leite, etc.

- . Substâncias químicas: Como formaldeídos, álcool acidificado, etc. Geralmente aplicada em utensílios e superfícies.
- . Filtração: aplicada na esterilização de líquidos ou gases. É um processo mais indicado para substâncias sensíveis ao calor.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparar 100 mL de meio de cultura indicado pelo professor e dividir em dois frascos. Um frasco será esterilizado em autoclave e outro mantido na estufa por 48 horas. Anotar os resultados, ressaltando as diferenças de crescimento de fungos e bactérias em meios líquidos.