

QUALIDADE NO PREPARO DE MEIOS DE CULTURA DESIDRATADOS

QUALITY IN THE PREPARATION OF DEHYDRATED CULTURE MEDIA

Cleiriane Lúcia dos Santos¹

RESUMO

Uma grande variedade de meios é utilizada para induzir o crescimento artificial de microrganismos que exigem diversos nutrientes, com isso denominam-se os meios de cultura. O presente artigo tem por objetivo estabelecer procedimentos para a qualidade no preparo manual dos meios de cultura desidratados. O desempenho e a transparência de um meio pronto são determinados pelo processo e cuidados empregados na dissolução do meio de cultura desidratado. Quando o preparo do meio de cultura é realizado no laboratório alguns cuidados básicos devem ser seguidos para garantir sua qualidade, atentar se as recomendações do fabricante; utilizar balanças calibradas; hidratar os meios com água destilada ou deionizada; seleção de vidrarias; precisão do pH; condições de esterilização; fluxo laminar; controle de esterilidade e de crescimento bacteriano.

Palavras-chave: Meios de cultura. Qualidade dos meios. Ágar.

ABSTRACT

A wide variety of media is used to induce the artificial growth of microorganisms which require various nutrients, this is called culture media. The present article aims to establish procedures for the quality in the manual preparation of dehydrated culture media. The performance and the transparency of a ready medium are determined by the process and care employed in the dissolution of the dehydrated culture media. When the preparation of the culture media is performed in the laboratory some basic care must be followed to ensure its quality, pay attention to the manufacturer's recommendations; Use calibrated scales; Hydrate the media with distilled or deionized water; Selection of glassware; pH accuracy; Sterilization conditions; laminar flow; Control of sterility and bacterial growth.

Keywords: Culture media. Quality of the media. Agar.

INTRODUÇÃO

No intuito de induzir o crescimento e a reprodução de microrganismos uma grande variedade de processos e de preparações nutricionais é utilizada. “Os diferentes micróbios exigem meios e nutrientes diversos, denominados meios de cultura [...] são preparados especiais com a finalidade de cultura e isolamento de microrganismos.” (SILVA; NEUFELD, 2006, pg. 458).

Os meios de cultura destinam-se ao cultivo artificial dos microrganismos, o desempenho e a transparência de um meio pronto podem ser determinados pelo

¹ Bióloga, formada pelas Faculdades Integradas de Ourinhos – SP e Acadêmica do curso de Pós Graduação em Microbiologia Micologia e Virologia da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP.

processo e cuidados empregados na dissolução do meio de cultura desidratado. Alguns microrganismos necessitam de substâncias que eles não podem sintetizar, tais como vitaminas e aminoácidos, as exigências nutritivas estão relacionadas a uma fonte de carbono, de nitrogênio, de energia e de sais minerais. Outras condições inerentes ao meio de cultura está relacionada às condições de pH, pressão osmótica e grau de umidade. (RIBEIRO; SOARES, 2005).

“Os fatores de crescimento também incluem as purinas e pirimidinas necessárias à síntese de ácidos nucleicos.” (SILVA; NEUFELD, 2006, pg. 459).

Corroborando com a ideia Ruiz (2008) afirma que vários produtos podem ser adicionados ao meio de cultura, para meios sólidos adiciona-se o ágar como agente solidificante, para o cultivo de microrganismos heterotróficos utilizam-se matérias-primas complexas, tais como peptonas, extratos de carne e de levedura.

O ágar é um agente gelificante para a preparação de meios de cultura microbiológicos. Esta substância que se obtém de determinadas espécies de algas vermelhas marinhas, é um poligalactosídeo cujos grupos hidroxila estão parcialmente esterificados com ácido sulfúrico. A imensa maioria dos microrganismos é incapaz de degradá-lo. (SILVA; NEUFELD, 2006, pg.462).

“Se o meio contiver fosfato ou outros tampões ativos, devemos ajustar as quantidades dos sais do tampão para obter o pH apropriado e não ácido, mudando, assim, o sal para sua forma ácida”. (Ribeiro; Soares, 2005, p.25).

De acordo com a Biobrás (2011), a determinação da qualidade da água que será utilizada na reidratação dos meios de cultura é de fundamental importância, essa água deve ser destilada ou deionizada e livre de cloretos, o pH deve estar entre 5,0 e 7,0.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o preparo de diversos meios de cultura serão necessários os seguintes materiais e equipamentos; balões volumétricos de fundo chato, Erlenmeyer, algodão, gaze, bandeja para transportar, placas de Petri estéreis, caneta retroprojetora, telas de amianto, luvas térmicas, balança, autoclave, fogão, banho-maria, bico de Bunsen, capela de exaustão, estufa bacteriológica, termômetro

infravermelho, pHmetro, relógio, refrigerador e o meio de cultura em pó que será preparado.

Definir uma periodicidade conforme a demanda dos exames microbiológicos. Se o preparo for realizado semanalmente é aconselhável que a quantidade seja adequada para estes dias, evitando o acúmulo de estoque. Antes de iniciar realize um levantamento dos meios que restaram da semana anterior, de acordo com a quantidade que restou; analisar o quanto será necessário preparar.

Para cada meio de cultura e de acordo com a marca específica checar no rótulo quantas gramas devem ser pesadas para o preparo de 1.000mL. Desse modo, aplica-se a regra de 3 para descobrir quantas gramas terá que pesar para o volume desejado.

Valor em gramas especificado em rótulo -----1.000mL

X-----Volume a ser preparado

*O volume a ser preparado deve ser avaliado, levando em consideração o estoque atual.

→ X será a quantidade em gramas a ser pesada

Medir a água deionizada ou destilada que será utilizada em um Erlenmeyer e reservar. Verificar a precisão da balança que será utilizada com pesos certificados pelo INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas), os erros de pesagem alteram a formulação final, o que pode afetar negativamente a cor, o pH, a gelificação e as características de crescimento dos microrganismos no meio de cultura. Colocar o balão volumétrico na balança e tarar, utilizar somente material de vidro perfeitamente lavado e enxugado, qualquer traço de material tóxico ou nutriente pode alterar as características do meio que está sendo preparado.

Pese o meio de cultura em uma área livre de correntes de ar e com pouca umidade, evite contato com a pele e inalação do pó durante a pesagem. Pese com precisão e rapidamente, não expondo o pó ao ar mais do que o necessário. Os meios devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido. Verter uma pequena quantidade de água no balão volumétrico com o meio de cultura em pó pesado, homogeneizar a fim de diluir e só depois acrescentar o restante da água. Segundo a Biobrás (2011), os meios que contêm ágar devem permanecer, em geral, durante 5-10 minutos em repouso na água, antes de serem aquecidos para se permitir que as partículas de ágar se reidratem adequadamente, elevando a solubilidade do ágar e resultando em gel mais uniforme.

Atentar as recomendações de cada fabricante do meio de cultura a ser preparado, sobre a necessidade de aquecimento acompanhado de fervura ou não.

Vedar o balão volumétrico com tampões de algodão e gaze, aquecer sobre a tela de amianto no fogão, ou em banho-maria ou no bico de Bunsen. Usar sempre luvas térmicas apropriadas para manipular vidrarias quentes. Aqueça agitando frequentemente sem deixar ferver se está for a indicação do fabricante, a parede da vidraria deve estar lisa sem pontos de Agar. Caso observe pontos, o aquecimento não foi suficiente para a total dissolução, retornar ao fogo para finalizar o procedimento.

Determine o pH eletrometricamente a 25°C, para meios com ágar transferir para um recipiente pequeno resfriar e inserir o eletrodo de pH, deixar que ele se equilibre (usualmente 3-5 minutos são necessários). O pH final do meio, após a autoclavação e resfriamento a 25°C, está indicado no rótulo de cada produto e normalmente não precisa ser reajustado. A adição de componentes pode afetar o pH final do meio. Não ajuste o pH até que todos os componentes tenham sido adicionados ao meio base. “O pH fora do especificado indica preparação inadequada e o meio não deve ser usado”. (BIOBRÁS, 2001, pg.21).

Atentar para instruções contidas no rótulo de cada produto, pois existem meios que não devem ser autoclavados.

Verifique a precisão da temperatura e controle de pressão da autoclave, utilizando para isso um indicador biológico, como por exemplo, esporos de *Bacillus stearothermophilus*, os quais morrem a 121°C, entre 12 a 15 minutos.

Preparar a autoclave de acordo com as instruções de cada modelo, as instruções abaixo se refere à autoclave vertical da Phoenix modelo AV30.

Encher a autoclave com água (8 litros) até o descanso do cesto, abaixar a tampa, ligar e deixar o botão no máximo até ferver a água, observar se a fervura atinge o cesto que será colocado o balão, caso isso ocorra abrir a válvula amarela que fica atrás da autoclave e retirar o excesso da água. Colocar os meios dentro da autoclave que já estará quente e com vapor. Fechar as 6 válvulas ao redor da autoclave (exceto a válvula superior). Marcar no relógio 5 minutos e esperar sair o vapor pelo bico da válvula superior. Quando o vapor sair, fechar e aguardar o manômetro atingir a temperatura de 120°C ideal da autoclave. Caso ultrapasse os 120° C abrir a válvula superior que estava fechada para a temperatura diminuir e depois fechar de novo, mas não deixar que ultrapasse para linha vermelha do

manômetro. Com a temperatura correta, colocar a autoclave no mínimo para manter e marcar 15 minutos para esterilização dos meios. Depois dos quinze minutos desligar e abrir a válvula superior para saída do vapor e da pressão. Quando o manômetro voltar ao zero abrir a autoclave.

De acordo com Oplustil et al. (2000, pg.181), as condições de esterilização para cada meio deve ser cuidadosamente observada, em geral o processo é realizado a 121°C por 15 minutos, porem em alguns casos a autoclavação deve ser feita em vapor fluente durante 20 minutos.

No decorrer do tempo, abrir as embalagens das placas e organizá-las na bancada de trabalho/capela, previamente limpa com álcool 70% e esterilizada com a luz UV.

Os meios esterilizados em seu recipiente final devem ser resfriados à temperatura ambiente o mais rápido possível. Ascender o bico de Bunsen plaquear os meios, a espessura padrão do meio deve ser sempre 4mm (25mL por placa lisa; 12,5mL para cada parte da placa com divisão). Após plaqueados, deixá-los na capela com a luz UV acesa por 20 minutos; cronometrar; desligar a luz UV antes de manusear as placas. “A distribuição dos meios deve ser feita em fluxo laminar para garantir a esterilidade de cada placa preparada.” (OPLUSTIL et al., 2000, pg.181). Tampá-las e verificar a espessura dos meios se estão no padrão 4mm. Lacrar com fita adesiva na vertical e especificar em todas as placas confeccionadas a data de fabricação, validade após preparo e número de lote criado para cada preparo. Recomendo que esta identificação seja realizada com caneta retroprojetora na parte em que o meio foi colocado e não na tampa, o uso de etiquetas se faz prático porem não indico devido ao ressecamento da goma a mesma pode se descolar da placa.

Armazená-las entre 2 a 8° C, antes de liberá-las para uso realizar controles de esterilidade e desenvolvimento bacteriano.

Separar uma porcentagem das placas preparadas e incubar na estufa a 35-37°C por 24 horas, analisar se houve crescimento bacteriano comprovando esterilidade dos meios. Providenciar cepas ATCC e testar em uma placa de cada meio preparado, ideal realizar controles positivos e negativos para validação.

“Se forem preparadas até 100 unidades, retirar uma unidade para o teste de esterilidade; acima de 100 unidades, retirar 5% do total produzido.” (OPLUSTIL et al., 2000, pg. 182).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As provas de controle de qualidade interno devem ser efetuadas para assegurar-se de que o funcionamento das características do meio está dentro das especificações fornecidas e que a metodologia empregada pelo usuário está dentro de normas pré-estabelecidas. Cada lote do meio de cultura preparado deve ser submetido às provas de controle de qualidade interno. Analisar a esterilidade das placas incubadas e o desenvolvimento bacteriano das cepas ATCC testadas, consulte as instruções do fabricante sobre as recomendações específicas e os resultados esperados. Veja um exemplo de meios e cepas usados com mais frequência na tabela 1.

Tabela 1: De acordo com o meio e algumas cepas utilizadas os resultados esperados são:

MEIO	CEPAS	RESULTADOS CONFORMES
Cled	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	HCB (houve crescimento de bactérias)
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	HCB (houve crescimento de bactérias)
MacConkey	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	NHCB(não houve crescimento de bactérias)
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	HCB (houve crescimento de bactérias)
MH	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	HCB (houve crescimento de bactérias)
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	HCB (houve crescimento de bactérias)
SS	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	HCB (houve crescimento de bactérias)

Reconstituir os meios de cultura é uma operação simples e fácil de efetuar. Entretanto, às vezes surgem dificuldades, e estas podem ter diversas causas como, por exemplo, falhas na alteração no pH isto pode ocorrer devido ao superaquecimento; mistura incompleta; esterilização excessiva; emprego de vidro alcalino; recipientes contaminados; água destilada ou deionizada impura ou de má qualidade; exposição prolongada a temperaturas altas; hidrólise dos ingredientes e caramelização; medição do pH com o meio ainda quente. Outras falhas podem estar relacionadas à espessura inferior ou superior ao recomendado; formulação do meio e contaminação durante o preparo.

Não autoclavar deficientemente ou excessivamente o meio de cultura, o tempo exato é determinado pelo volume do meio. O uso de um indicador biológico ajuda a determinar o tempo adequado para autoclavar grandes volumes de meio por métodos de provas e erros. Autoclavação deficiente pode resultar em um meio não estéril, uma autoclavação excessiva pode levar a formação de precipitados, alteração de pH, caramelização, redução do poder gelificante dos meios com ágar e alteração nas respostas dos microrganismos cultivados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os meios de cultura devem ser preparados com muita atenção e cautela, uma etapa mal executada pode interferir no resultado final e interferir no crescimento bacteriano ou desempenho de antimicrobianos prejudicando seu diagnóstico e consequentemente o cliente infectado.

REFERÊNCIAS

BIOBRÁS, S.A. **Catálogo de meios de cultura**. Brasil: Biobrás diagnósticos, 2001.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática roteiro e manual: Bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

RUIZ, R.L. **Manual prático de Microbiologia básica**. São Paulo: USP, 2008.

SILVA, C.H.P.M.; NEUFELD, P.M. **Bacteriologia e Micologia: Para o Laboratório Clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.