

Preparo dos meios de cultura e soluções

Recomenda-se que, antes da manipulação e descarte das substâncias, sejam consultadas fichas próprias ou manuais de segurança.

Na ausência de especificações, os reagentes devem apresentar grau analítico adequados à microbiologia ou biologia molecular, conforme aplicação.

Ao adquirir meios de cultura, observar atentamente a formulação comercial, comparando-a com aquela indicada neste manual. Meios de cultura desidratados fornecidos por diferentes fabricantes podem apresentar pequenas diferenças em suas composições. Às vezes, as diferentes marcas utilizam diferentes termos para uma mesma substância. Por exemplo, os termos triptona e tripticase referem-se à peptona de caseína obtida por digestão triptica ou pancreática. Observar atentamente a quantidade necessária de meio desidratado, em gramas por litro de meio a ser preparado, o modo de preparo, o tempo e a temperatura de esterilização em cada caso.

A definição do prazo de validade de lotes de meios de cultura e soluções deve obedecer a recomendações do fabricante, quando disponíveis, seguindo-se as instruções específicas para validade e condições de armazenamento. Na ausência de recomendações do fabricante, ou especificidades técnicas contrárias, indica-se como orientação validade de 2 a 4 semanas, armazenados a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, para meios de cultura em placas (devidamente acondicionados) e validade de 3 a 6 meses, armazenados a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, para meios em tubos ou frascos (ISO 11133:2014). Caso qualquer componente do preparo possua prazo de validade inferior ao estabelecido pelo fabricante do meio ou pelas recomendações da ISO 11133:2014, deve prevalecer o prazo mais restritivo.

Nos casos comprovados em que os meios de cultura listados neste anexo não forem aplicáveis, é requisito prévio para a realização de análises microbiológicas confiáveis que os meios de cultura indicados atendam a critérios mínimos de desempenho, demonstrando: adequação ao uso pretendido e capacidade de produzir resultados consistentes.

1. Meios de cultura

Meio 79 ou YMA (Yeast Manitol Ágar) com corante Vermelho Congo (CRYMA - Congo Red Yeast Manitol Ágar)

Composição:

- Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) - 0,5 g
- Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,2 g
- Cloreto de Sódio (NaCl) - 0,1 g
- Manitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) - 5,0 g
- Extrato de levedura - 0,4 g
- Ágar-ágar - 15,0 g
- Solução 0,25% (m/v) de vermelho Congo - 10 mL
- Água destilada/deionizada - q.s.p. 1.000 mL
- pH $6,9 \pm 0,2$

Preparo:

Pesar separadamente os componentes de acordo com o volume de meio a ser preparado. Em recipiente adequado, dissolver em água destilada/ deionizada os componentes na ordem indicada na formulação. Completar o volume de água destilada/ deionizada correspondente. Verificar necessidade de ajuste de pH, utilizar solução de NaOH 0,1 M para elevar o pH e solução de HCl 0,1 M para baixar o pH do meio de cultura. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Para o preparo do meio YMA na forma líquida, meio YM (Yeast Manitol), devem ser excluídos o ágar-ágar e a solução de vermelho Congo a 0,25% (m/v).

Referência:

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. *Laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 145 p.

VINCENT, J. M. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

Meio ágar soja triptona (TSA)

Composição:

Triptona (peptona de caseína-digestão triptica ou pancreática) - 15,0 g

Peptona de farinha de soja - 5,0 g

Cloreto de Sódio (NaCl) - 5,0 g

Ágar-ágar - 15,0 g

Água destilada/deionizada - qsp 1.000 mL

pH 7,3 \pm 0,2

Preparo:

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Em recipiente adequado, dissolver em água destilada/ deionizada. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Para o preparo do meio YM (Yeast Manitol), meio YMA na forma líquida, devem ser excluídos o ágar-ágar e a solução de vermelho Congo a 0,25% (m/v).

Meio King B

Composição:

Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) - 1,5 g

Peptona - 20 g

Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) - 1,5 g

Glicerol - 10mL

Ágar-ágar - 15,0 g

Água destilada/deionizada - qsp 1.000 mL

pH 7,2 \pm 0,2

Preparo:

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Em recipiente adequado, dissolver em água destilada/deionizada. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Referência:

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 44, n. 2, p. 301–307, ago. 1954.

Meio Rojo Congo (RC)

Composição:

Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) - 0,5 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) - 0,2 g
Cloreto de Sódio (NaCl) - 0,1 g
Extrato de levedura - 0,5 g
Cloreto férrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) - 0,015 g
DL-ácido málico - 5,0 g
Hidróxido de potássio (KOH) - 4,8 g
Solução 0,25% (m/v) de vermelho Congo - 15,0 mL
Ágar-ágar - 20,0 g
Água destilada/deionizada - qsp 1.000 mL
pH $7,0 \pm 0,2$.

Preparo:

Pesar separadamente os componentes de acordo com o volume de meio a ser preparado. Em recipiente adequado, dissolver em água destilada/ deionizada os componentes na ordem indicada na formulação. Completar o volume de água destilada/ deionizada correspondente. Verificar necessidade de ajuste de pH, utilizar solução 0,1N de KOH. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Para o preparo do meio RC na forma líquida devem ser excluídos o ágar-ágar e a solução de vermelho Congo a 0,25% (m/v).

Referência:

CASSÁN, F.; PENNA, C.; CREUS, C.; RADOVANCICH, D.; MONTELEONE, E.; SALAMONE, I. G.; DI SALVO, L.; MENTEL, I.; GARCÍA, J.; PASARELLO, M. C. M.; LETT, L.; PUENTE, M.; CORREA, O.; VALERIO, K. P.; MASSA, R.; CATAFESTA, M.; ROSSI, A.; DÍAZ, M.; RIGHES, S.; CARLETTI, S.; CÁCERES, E. R. *Protocolo para el control de calidad de inoculantes que contienen Azospirillum sp.* Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2010. 13 p. (Documento de Procedimientos de la REDCAI - Red de Control de Calidad de inoculantes, n. 2).

Caldo peptona de caseína e soja (TSB)

Composição:

Peptona - 20 g

Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) - 2,5 g
Dextrose (Glicose) - 2,5 g
Cloreto de Sódio (NaCl) - 5,0 g
Água destilada/deionizada - qsp 1.000 mL
pH $7,3 \pm 0,2$

Preparo:

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Em recipiente adequado, dissolver em água destilada/deionizada. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Meio ágar nutriente (AN)

Composição:

Peptona - 5,0 g
Extrato de carne - 1,0 g
Extrato de levedura - 2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) - 5,0 g
Ágar - 15,0 g
pH $7,4 \pm 0,2$

Preparo:

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Em recipiente adequado, dissolver em água destilada/deionizada. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Para o preparo do meio YM (Yeast Manitol), meio YMA na forma líquida, devem ser excluídos o ágar-ágar e a solução de vermelho Congo a 0,25% (m/v).

Meio ágar batata dextrose (BDA)

Composição:

Extrato de batatas (Infusão de 200g de batatas) 4 g
Dextrose (D(+)-glucose) 20 g
Ágar-ágar - 15,0 g
Água destilada/deionizada - qsp 1.000 mL
pH $5,6 \pm 0,2$.

Preparo:

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Em recipiente adequado, dissolver em água destilada/deionizada. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Aditivo para facilitar a contagem de colônias (desenvolvimento de Unidade Formadoras de Colônias (UFC's) mais compactas): adicionar 0,1% (v/v) de Octilfenoxi poli(etileno)etanol, N° CAS 9002-93-1 (denominação comum: Triton X-100), durante o preparo do meio.

2. Soluções

Solução 0,25% (m/v) de vermelho Congo

Pesar 0,25 g de vermelho Congo (reagente com concentração de corante $\geq 80\%$) e transferir para um recipiente adequado. Dissolver em 100 mL de água destilada/deionizada. Armazenar sob refrigeração, em frasco de vidro âmbar.

Solução 0,85% (m/v) de cloreto de sódio (NaCl)

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio (NaCl). Transferir para um recipiente adequado. Dissolver em 1000 mL de água destilada/deionizada. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.

Solução 0,85% (m/v) de cloreto de sódio (NaCl) com 0,1% (v/v) de Polissorbato 80 (denominação comum: Tween 80)

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio (NaCl). Transferir para um recipiente adequado. Dissolver em água destilada/deionizada, acrescentar 1 mL de Polissorbato 80 (N° CAS 9005-65-6) e completar o volume para 1000 mL. Acondicionar volumes de acordo com a necessidade (não excedendo $\frac{3}{4}$ da capacidade do recipiente) e identificar adequadamente. Autoclavar sob condições que garantam a esterilização do meio de cultura.