

# **DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS**

**Sara Filipa Rodrigues Tracana**

Relatório de estágio apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e Doutora Carla Mendes Loureiro da Indústria Farmacêutica, IBERFAR, S A.

## Agradecimentos

Com uma das etapas terminada, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram e apoiaram nestes três meses de estágio.

À Indústria Farmacêutica IBERFAR, S A., pela disponibilidade para a realização do estágio.

À Dr.<sup>a</sup> Ana Baptista, pela simpatia e pelo à vontade que mostrou.

À Dr.<sup>a</sup> Carla Loureiro, minha orientadora na IBERFAR, por toda a disponibilidade, amizade, orientação no trabalho e revisão do texto.

À Professora Doutora Cristina Pintado, minha orientadora da Escola Superior Agrária, também por toda a disponibilidade, amizade, orientação no trabalho e revisão do texto.

À minha família pelo incentivo e enorme paciência.

Aos meus pais e irmão, pela confiança e carinho em mim.

Aos meus grandes amigos, que sempre demonstraram disponibilidade e acima de tudo uma grande amizade.

## Resumo

Com este trabalho pretendeu-se avaliar meios de cultura desidratados provenientes de diferentes fornecedores, lotes e esterilizações. Os diferentes tipos de meios (gerais, de enriquecimento e selectivos) foram preparados no laboratório tendo por objectivo a sua monitorização mensal até ao prazo de validade pré-definido (três e seis meses). Ao longo do tempo foi também testado se os mesmos mantêm as suas características iniciais nas condições de armazenamento também pré-definidas (temperatura e luz).

No decorrer do estudo foram utilizados meios de cultura no estado sólido e líquido como também a utilização de dois métodos de isolamento: método de espalhamento em placa e método por incorporação. Ao longo dos três meses foram realizados ensaios de promoção de crescimento nos respectivos meios em estudo utilizando as estirpes adequadas, de acordo com a Farmacopeia Europeia em vigor.

De forma a complementar o estudo e confirmar a presença de determinados microrganismos procedeu-se à identificação dos isolados a partir dos meios selectivos, recorrendo à coloração de Gram, a exames microscópicos e a galerias de identificação API.

Por fim, os resultados encontrados em cada tempo de ensaio foram discutidos de modo a avaliar as diferenças e as características dos meios ao longo dos três meses, como também, a verificação da promoção de crescimento e o prazo de validade dos meios de cultura em estudo.

Considerando os resultados obtidos, foi possível constatar o prazo de validade dos meios testados.

**Palavras-chave:** Meios de Cultura (Promoção de Crescimento), Taxa de Resuperação, Prazo de Validade, Ensaio Microbiológicos

## Abstract

With this work we intended to evaluate dehydrated culture media from different suppliers, lots and sterilizations. The different kind of media (general, enrichment and selective) were prepared in the lab, being monitored monthly until its expiration date (three to six months). It was also tested if those culture media maintain the same initials conditions over the time, in predefined storage conditions (light and temperature).

In this study, were used solid and liquid culture media, as well two isolation methods: spread-plate and pour-plate. Were performed assays to provide growth in each culture media, using adequate strains over three months. All these experiments were according to the current European Pharmacopoeia.

To complete the study and to confirm the presence of some microorganisms was proceeded to the identification of the microbial isolates from the selective media, using Gram coloration, microscopic examination tests and API identification galleries.

All the results were discussed to evaluate the differences and the characteristics of the culture media over the three months, as well the verification of growth promotion and the expiration dates of these media.

Considering the results obtained, it was possible to verify the validity of tested medium.

**Keywords:** Culture Medium (Growth promotion), Recovery Rate, Period of Validity, Microbiological Assays

# Índice geral

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Índice geral.....	v
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas .....	viii
Lista de abreviaturas .....	ix
I Introdução .....	1
II Revisão Bibliográfica.....	3
1-Meios de cultura .....	3
2 - Ensaio Microbiológicos.....	5
2.1- Microrganismos .....	5
2.1.1 <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	6
2.1.2 - <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.2.3 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
2.2.4 - <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
2.2.5 - <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
2.2.6 - <i>Candida albicans</i> .....	7
2.2.7 - <i>Aspergillus niger</i> .....	7
2.2 - Inoculação .....	7
.....	8
2.3 - Incubação .....	8
2.4 - Crescimento Microbiano.....	9
2.5 - Identificação de Microrganismos .....	10
III Material e Métodos .....	11
1-Meios de Cultura Desidratados.....	12
2-Meios de Cultura Prontos .....	14
3-Microrganismos usados no ensaio .....	14
4-Verificação do Inóculo.....	15
5-Ensaio de Quantificação Microbiana .....	16
5.1 Métodos de inoculação.....	16
5.2 Testes de Promoção ou Inibição de Crescimento.....	16
5.3 Ensaio .....	18
5.4 Incubação dos meios de cultura inoculados .....	19
5.5 Identificação de Microrganismos.....	20
5.5.1- Coloração de Gram/Observação ao Microscópio .....	20
5.5.2-Teste da oxidase .....	21
5.5.3-Teste API.....	21
IV Resultados e discussão .....	21
1-Resultados da verificação do inóculo .....	21
2-Resultados dos Meios Utilizados na Quantificação Microbiana ( $t_0$ , $t_1$ , $t_2$ , $t_3$ ).....	22

3-Resultados dos Meios Utilizados na Pesquisa de Microrganismos Patogénicos .....	24
V-Considerações finais.....	31
Bibliografia .....	32
Anexos .....	33
Anexo I - Folha de Registo .....	33
Anexo II - Dados da Preparação dos Meios de Cultura .....	34
.....	34
Anexo III - Certificados dos Microrganismos .....	42
Anexo IV - Verificação dos Inóculo dos Vários Microrganismos Liofilizados .....	43
Anexo V - Certificados dos Meios.....	44
Anexo VI - Resultados dos Meios .....	51

## Índice de figuras

Figura 1 - Técnica de incorporação a partir de amostras diluídas .....	7
Figura 2 - Método de espalhamento à superfície .....	8
Figura 3 - Método por incorporação .....	8
Figura 4 - Galerias API de testes negativos para diferentes identificações. ....	10
Figura 5 - Embalagens dos meios de cultura desidratados.....	12
Figura 6 - Local de armazenamento dos meios. ....	14
Figura 7 - Esquema do procedimento efectuado na incorporação dos diferentes microrganismos nos meios de cultura TSA e SAB. ....	18
Figura 8 - Crescimento de microrganismos em meios líquidos: MacConkey broth (A), TSB (B), EEB (C) e Rappaport Vassiliadis (D). ....	25
Figura 9 - Resultados do meio MacConkey agar e do meio Cetrimida com local de armazenamento diferente. ....	26
Figura 10 - Crescimento dos microrganismos em meio Mannitol (A) e XLD (B) nos três tempos de ensaio. ....	27
Figura 11 - Resultados dos testes API.....	28

## Índice de tabelas

Tabela 1 Condições de armazenamento e conservação dos meios de cultura pré-estabelecidos. .	11
Tabela 2 - Dados dos Meios de Cultura Preparados. ....	13
Tabela 3 - Preparação de estirpes teste .....	15
Tabela 4 - Resumo dos métodos utilizados na avaliação dos vários meios de cultura .....	16
Tabela 5 - Planeamento e datas previstas. ....	17
Tabela 6 - Descrição dos microrganismos a utilizar, das condições de incubação e limite dos ensaios para os diferentes meios de cultura .....	19
Tabela 7 - Volume de inóculo utilizado para as estirpes .....	21
Tabela 8 - Resultados do meio TSA pelo método de incorporação.....	22
Tabela 9 - Resultados do meio SAB pelo método de incorporação.....	23
Tabela 10 - Resultados do meio TSA+Lecitina+Polisorbato 80 pelo método de incorporação.....	23
<b>Tabela 11</b> - Resultados do meio Sabouraud Chloramphenicol Agar pelo método de incorporação	23
Tabela 12 - Resultados do meio R2A pelo método de incorporação .....	23
Tabela 13 - Resultados obtidos para o estudo dos meios líquidos.....	24
Tabela 14 - Resultados obtidos para o estudo dos meios sólidos.....	25
Tabela 15 - Resultados do meio VRBGA com fornecedores diferentes (Merck e BD) .....	26
Tabela 16 Observação da cor das colónias e respectivos meios .....	27

## Lista de abreviaturas

API	Automatic Profile Index
ATCC	American Type Culture Collection
BD	Becton Dickinson
EEB	Enterobacteria Enrichment Broth
GMP	Good Manufacturing Practice
GLP	Good Laboratory Practice
SAB	Sabouraud Dextrose Agar
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Triple Sugar Iron Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VRBGA	Violet Red Bile Glucose Agar
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar