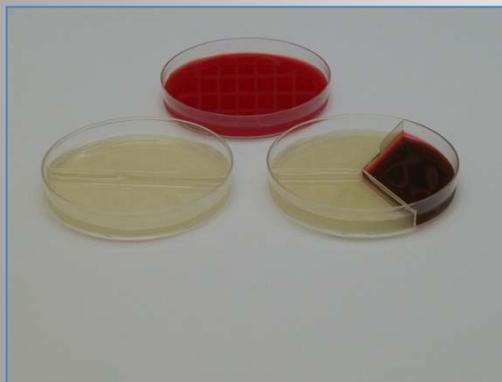
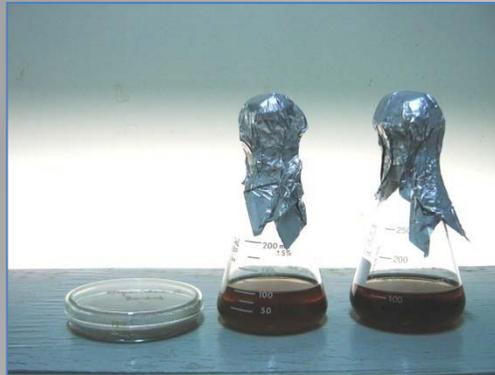


Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Departamento de Fitopatologia e Nematologia



MEIOS DE CULTURA

Meios de Cultura

Conceito

Substrato que contém nutrientes necessários ao desenvolvimento de microrganismos em condições de laboratório.



Composição

➤ Água:

- Fungos se desenvolvem a partir de um substrato que forneça pelo menos 12% de água;
- Bactérias em condições acima de 20% de água no substrato.

Meios de Cultura

Composição

➤ **Macroelementos:**

-Elementos minerais requeridos em quantidades relativamente altas (C, N, P, K, Ca, Mg). Requeridos em concentrações em torno de 10^{-3} M.

- **Formas utilizadas:**

- Carbono: glicose, sacarose, frutose, amido, maltose, lactose, arabinose;
 - Nitrogênio orgânico: caseína, asparagina e neopeptona;
 - Nitrogênio sais: nitrato sódio, cloreto amônia, sulfato amônia e uréia;
 - Fósforo: fosfato potássio monobásico (KH_2PO_4);
 - Potássio: cloreto potássio, fosfato potássio dibásico (K_2HPO_4);
 - Magnésio: cloreto magnésio e sulfato magnésio;
 - Cálcio: cloreto cálcio
- Peptona: produto (substrato) obtido pela hidrólise de proteínas de natureza animal (caseína e carne) e vegetal (soja)

Meios de Cultura

Composição

➤ **Microelementos ou oligoelementos:**

-Elementos minerais (Mn, Mo, Zn, Cu, Fe) que devem estar presentes no meio em quantidades relativamente baixas (traços). Utilizados em concentrações de aproximada/e 10^{-6} a 10^{-9} .

-Manganês: cloreto manganês;

- Molibdênio: molibdato sódio;

- Zinco: cloreto zinco;

- Cobre: sulfato cobre;

- Ferro: sulfato ferro e cloreto ferro.

Meios de Cultura

Composição

➤ **Fatores de crescimento ou suplementos:**

-Envolvem principalmente compostos do tipo aminoácidos e vitaminas, os quais não são sintetizados pelo organismo a ser cultivado.

-Vitaminas: tiamina* [B1], biotina* [B7], riboflavina [B2], ác. nicotínico [B3], ác. pantotênico [B5], piridoxina [B6], cianocobalamina [B12] atuam como coenzimas; inositol estrutura de membrana, ác. p-aminobenzóico. Quantidade fornecida ao meio variável 10^{-5} a 10^{-10} M.

-Aminoácidos: DL-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ác. aspártico, DL-fenilalanina, L-ác. glutâmico, L-glicina, DL-isoleucina, DL-leucina, L-prolina, DL-serina, L-tirosina. Quantidade fornecida ao meio: 0,2g de N/L.

Meios de Cultura

Composição

➤ Ágar:

- Agente solidificante, introduzido na elaboração de meios de cultura ~ 1880;
- Obtido a partir de alga marinha;
- Polissacarídeo de composição complexa e, portanto, inerte no meio;
- Dificilmente decomposto por microrganismos, não alterando a composição nutricional do meio;
- Utilizado na proporção de 1,5 a 2,0 %;
- Características: ponto fusão próximo 100°C e ponto solidificação ~ 45°C.

Tipos de Meios de Cultura

- Sintéticos
- Semi-sintéticos;
- Naturais ou complexos;

- Seletivos;
- Não-seletivos;
- Diferenciais

Tipos de Meios de Cultura

➤ Sintéticos

- São qualitativa e quantitativamente definidos em relação aos seus componentes;
- Utilizados obrigatoriamente em estudos de fisiologia microbiana;
- Exemplo: Meio para formação de peritécio de *Sordaria destruens*

Glicose	5,0 g
KNO₃	3,5 g
KH₂PO₄	1,7 g
MgSO₄	0,7 g
Ágar	15 g
Água destilada	1 litro

Tipos de Meios de Cultura

➤ Semi-Sintéticos

-Contém alguns componentes definidos e outros de composição parcialmente conhecida e variável;

-Empregados rotineiramente em laboratórios de Fitopatologia;

-Exemplo: Meio de batata-dextrose-ágar (BDA)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	1 litro

Tipos de Meios de Cultura

➤ Naturais ou Complexos

-São geralmente constituídos de partes ou de infusões de tecidos vegetais como folhas, sementes, raízes e frutos;

-Apresentam a vantagem de favorecer a esporulação e a desvantagem de serem variáveis e não fornecerem sempre as mesmas condições nutricionais para o microrganismo;

-Exemplo: Meio para produção de peritécios de *Venturia inaequalis*

Folhas secas de macieira	25 g
Extrato de malte	5 g
Ágar	25 g
Água destilada	1 litro

Tipos de Meios de Cultura

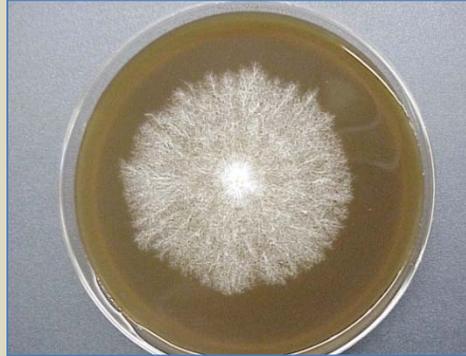
➤ Seletivos

- Se caracterizam por favorecer o desenvolvimento de um grupo ou de um determinado microrganismo;
- Fator de seletividade pode ser conferido por antibióticos, fungicidas, corantes, acidez/alcalinidade
- Antibióticos: oxitetraciclina, penicilina, cloranfenicol, estreptomicina;
- Fungicidas: PCNB, kasugamicina,
- Corantes: cristal violeta, verde Malaquita, rosa bengal;
- pH

Tipos de Meios de Cultura

➤ Seletivos

Acidez e alcalinidade



- **fungos** são favorecidos por condições de acidez do meio (pH 5-6); uso de ácido lático 25%, 3-5 gotas/100 mL de meio, após autoclavagem do meio.

- **bactérias** se desenvolvem melhor em meios próximos da neutralidade ou levemente alcalinos (pH 6-8);



Tipos de Meios de Cultura

➤ Seletivos

- Exemplo: Meio de Martin para isolamento de fungos do solo

KH₂PO₄	1,0 g
MgSO₄.7H₂O	0,5 g
Peptona	5,0 g
Dextrose	10 g
Rosa Bengal	0,033 g
Estreptomicina	0,03 g
Ágar	20 g
Água destilada	1 litro

Tipos de Meios de Cultura

➤ Não-Seleativos

-Caracterizam-se por permitir o desenvolvimento de uma grande variedade de microrganismos;

-Exemplo:

- Meio de batata-dextrose-ágar (BDA) para fungos e bactérias fitopatogênicas
- Meio nutriente-ágar para diversos gêneros de bactérias fitopatogênicas

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Extrato de leveduras	5,0 g
Dextrose	10 g
Ágar	20 g
Água destilada	1 litro

Tipos de Meios de Cultura



Meios Semi-seletivos

Colônias de *Ralstonia solanacearum* em meio de BDA (A) e em meio de Kelman com tetrazólio (B). (Giuliana Baggio)



This medium consisting of peptone - 5g, meat extract - 3g, sucrose - 5g, agar - 15g, skim milk powder - 5g, Congo red - 0.05g, chlorothalonil - 0.01g, thiophanate methyl - 0.01g, nalidixic acid - 0.01g, nitrofurantoin - 0.01g, oxacillin 0.001g, sodium azide - 0.001g, and distilled water q.s. 1L.

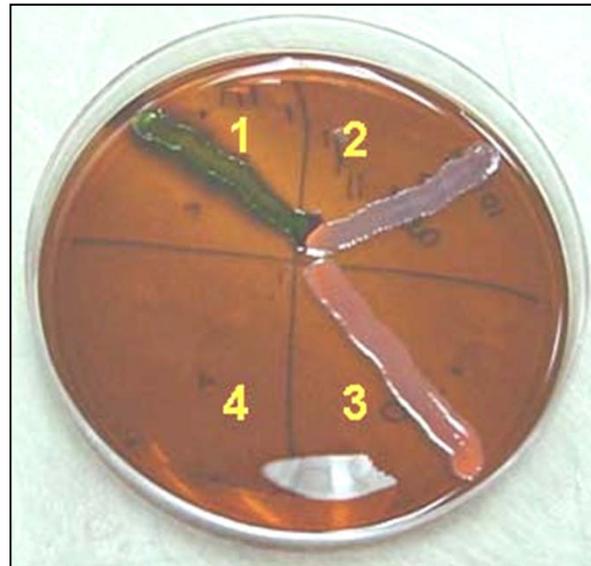
Detecção de Curtobacterium

flaccumfaciens pv.flaccumfaciens em sementes de feijoeiro utilizando meio de cultura semi-seletivo. A. C. Maringoni; R.C. Camara. Braz. J. Microbiol. vol.37 (4), 2006.

Tipos de Meios de Cultura

➤ Diferenciais

- Nesse meio, determinadas espécies produzem colônias características, as quais permitem a rápida identificação do microrganismo desejável;
- Distinção de *Aerobacter aerogenes* (colônias grandes, róseas, sem brilho) de *Escherichia coli* (colônias pequenas, escuras, com brilho metálico) em meio de eosina-azul de metileno (BEM)



Tipos de Meios de Cultura

➤ GENERALIDADES

- Meios pobres em carboidratos e ricos em material vegetal podem induzir ou estimular a produção de esporos.
- **Meios sólido**: usados para obtenção de culturas puras de patógenos.
- **Meios líquidos**: não adequados por favorecem misturas de estruturas diversas.
- **Meios sólidos** usados p/ estudos de morfologia/fisiologia (facilitam avaliação).
- **Meios líquidos** usados para aumento da quantidade de inóculo (micélio).
- Acerto de pH antes da autoclavagem (HCl / Hidróxido de sódio).
- A cada autoclavagem o valor do pH do meio baixa em 0,1 - 0,2.
- Temperatura de autoclavagem : vapor + 1,0 atm = 121°C por **20'**
- Acrescentar antibiótico, aminoácido, vitamina após autoclavagem

O papel dos componentes de um meio de cultura sobre características de fungos



Efeito da composição do meio sobre o crescimento de fungo

Tabela 6. Efeito da suplementação do meio mínimo com extrato de levedura e caseína hidrolisada sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose.

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM	0,00	0,00	0,00	0,00
EL	23,33	15,33	19,33	19,33 b
CH	50,67	58,00	58,67	55,78 a
MC	57,33	55,33	62,67	58,44 a

CV = 6,81%; Δ Tukey 5% = 6,29.

Efeito da composição do meio sobre o crescimento de fungo

Tabela 8. Efeito da suplementação do meio mínimo com aminoácidos sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose.

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM	0,00	0,00	0,00	0,00
MM + I	20,00	16,33	17,67	18,02 c
MM + II	32,33	23,67	17,00	24,33 b
MM + III	0,00	0,00	0,00	0,00
MM + CH	70,33	84,33	76,33	77,00 a

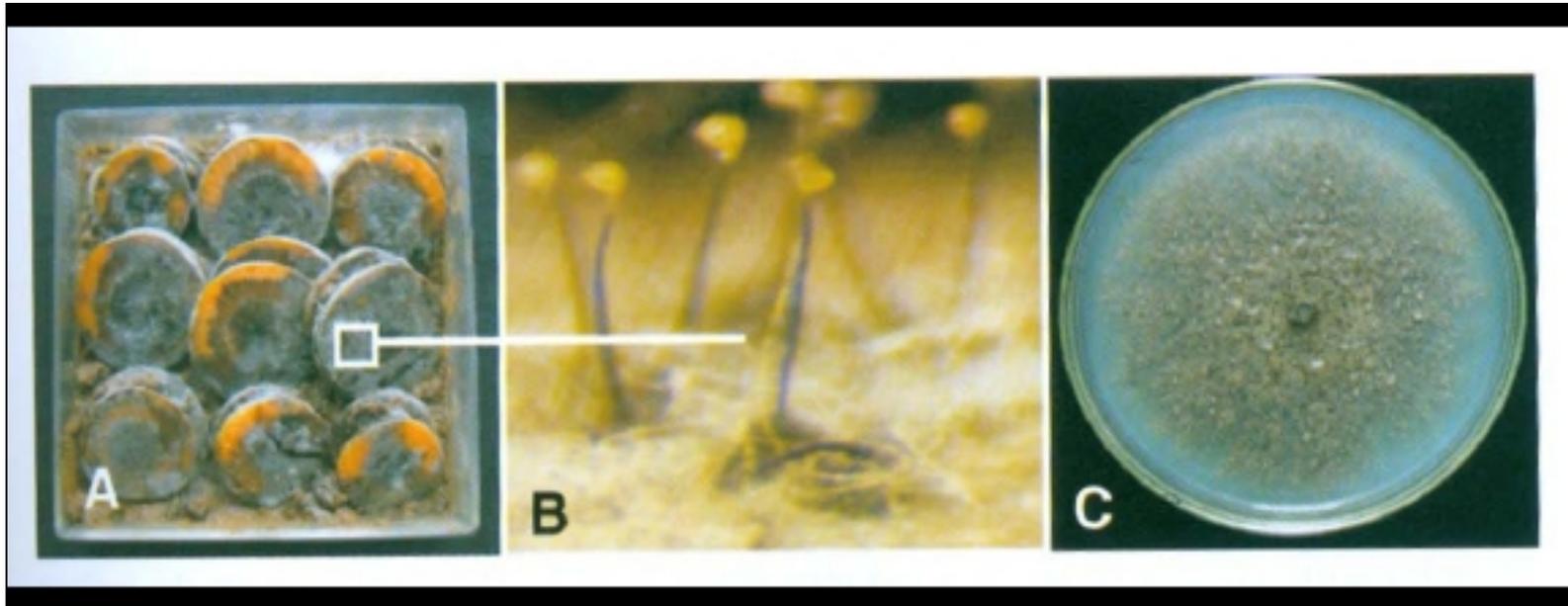
CV = 7,65%; Δ Tukey 5% = 6,24

Efeito da composição do meio sobre o crescimento de fungo

Tabela 9. Efeito da omissão de aminoácidos, isoladamente, de meio mínimo suplementado com grupos de aminoácidos, sobre o crescimento de *Colletotrichum* da rapose

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM + I	41,7	56,5	44,7	47,0 a
MM + I-A	51,7	60,3	30,3	47,43 a
MM + I-B	51,0	45,7	38,3	45,00 ab
MM + I-C	58,3	54,7	39,0	50,67 a
MM + I-D	47,3	50,0	33,7	43,67 abc
MM + I-E	37,3	34,0	37,3	36,33 bcd
MM + I-F	77,3	33,7	29,7	46,90 a
MM + II	33,7	25,7	23,7	27,70 d
MM + II-G	0,0	0,0	0,0	0,00
MM + II-H	0,0	0,0	0,0	0,00
MM + II-I	37,7	35,7	27,3	35,57 bcd
MM + II-J	52,0	58,3	32,0	47,43 a
MM + II-L	33,0	37,7	31,0	33,90 d
MM + II-M	37,7	34,7	31,0	34,47 cd

CV = 14,72%; Δ Tukey 5% = 9,69



O papel dos componentes de um meio de cultura sobre características de fungos

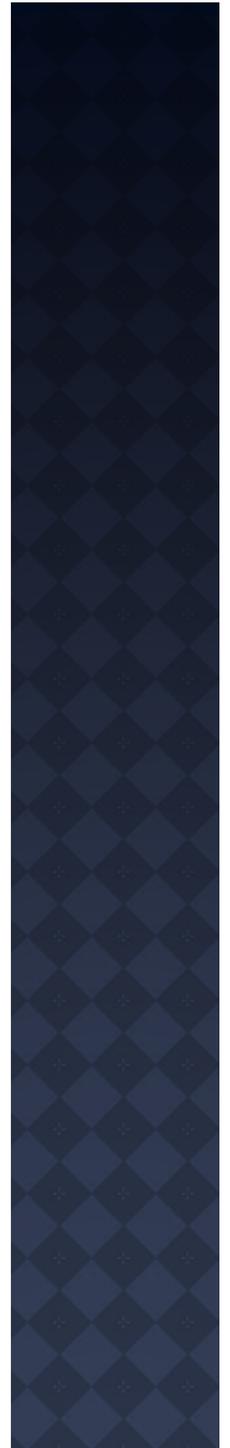


Tabela 6. Efeito da suplementação do meio mínimo com extrato de levedura e caseína hidrolisada sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose.

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM	0,00	0,00	0,00	0,00
EL	23,33	15,33	19,33	19,33 b
CH	50,67	58,00	58,67	55,78 a
MC	57,33	55,33	62,67	58,44 a

CV = 6,81%; Δ Tukey 5% = 6,29.

- ¹ MM: meio mínimo; EL: meio mínimo + extrato de levedura;
CH: meio mínimo + caseína hidrolisada; MC: meio mínimo +
extrato de levedura + caseína hidrolisada.
- ² Média de 3 repetições, avaliação feita aos 7 dias de idade.
- ³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Obs.: Para efeito de análise estatística o crescimento dos isolados em MM não foi considerado.

Meio mínimo-MM (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por KIMATI, 1975)

Glucose	10g
NaNO ₃	6g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
Solução de micronutrientes	1ml
Ágar Difco	15g
Água destilada	1000ml

Solução de micronutrientes (LILLY & BARNETT, 1951)

Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	723,4mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	439,8mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	203,0mg

Meio mínimo com caseína hidrolisada

Meio mínimo 1000ml

Caseína hidrolisada 1,5g

Meio mínimo com extrato de levedura

Meio mínimo 1000ml

Extrato de levedura 0,5g

Meio completo

Meio mínimo 1000ml

Caseína hidrolisada 1,5g

Extrato de levedura 0,5g

Tabela 8. Efeito da suplementação do meio mínimo com aminoácidos sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose.

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM	0,00	0,00	0,00	0,00
MM + I	20,00	16,33	17,67	18,02 c
MM + II	32,33	23,67	17,00	24,33 b
MM + III	0,00	0,00	0,00	0,00
MM + CH	70,33	84,33	76,33	77,00 a

CV = 7,65%; Δ Tukey 5% = 6,24

- ¹ MM: meio mínimo; I: DL - alanina, L - arginina, L - ácido glutâmico, glicina, L - prolina e L - tirosina; II: L asparagina, DL - ácido aspártico, DL - isoleucina, DL - leucina, DL - fenilalanina e DL - serina; III: DL - valina, DL - treonina, L - histidina, L - lisina, DL - metionina e DL - triptofano; CH: caseína hidrolisada.
- ² Média de 3 repetições, avaliação feita aos 7 dias de idade.
- ³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Obs.: Para efeito de análise estatística o crescimento dos isolados em MM e MM + III não foi considerado.

Tabela 9. Efeito da omissão de aminoácidos, isoladamente, de meio mínimo suplementado com grupos de aminoácidos, sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM + I	41,7	56,5	44,7	47,0 a
MM + I-A	51,7	60,3	30,3	47,43 a
MM + I-B	51,0	45,7	38,3	45,00 ab
MM + I-C	58,3	54,7	39,0	50,67 a
MM + I-D	47,3	50,0	33,7	43,67 abc
MM + I-E	37,3	34,0	37,3	36,33 bcd
MM + I-F	77,3	33,7	29,7	46,90 a
MM + II	33,7	25,7	23,7	27,70 d
MM + II-G	0,0	0,0	0,0	0,00
MM + II-H	0,0	0,0	0,0	0,00
MM + II-I	37,7	35,7	27,3	35,57 bcd
MM + II-J	52,0	58,3	32,0	47,43 a
MM + II-L	33,0	37,7	31,0	33,90 d
MM + II-M	37,7	34,7	31,0	34,47 cd

CV = 14,72%; Δ Tukey 5% = 9,69

Para a suplementação das misturas, os aminoácidos foram agrupados da seguinte forma:

I: DL-alanina, L-arginina, L-ácido glutâmico, glicina, L-prolina e L-tirosina.

II: L-asparagina, DL-ácido aspártico, DL-isoleucina, DL-leucina, DL-fenilalanina e DL-serina.

III: DL-valina, DL-treonina, L-histidina, L-lisina, DL-metionina e DL-triptofano.

Tabela 9. Continuação

- ¹ I: DL-alanina, L-ácido glutâmico, L-arginina, glicina, L-prolina e L-tirosina.
A: DL-alanina; B: L-ácido glutâmico; C: L-arginina; D: glicina; E: L-prolina; F: L-tirosina.
II: L-asparagina, DL-ácido aspártico, DL-isoleucina, DL-leucina, DL-fenilalanina e DL-serina.
G: L-asparagina; H: DL-ácido aspártico; I: DL-isoleucina;
J: DL-leucina; L: DL-fenilalanina; M: DL-serina.
- ² Média de 3 repetições, avaliação feita aos 20 dias de idade.
- ³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Obs.: Para efeito de análise estatística o crescimento dos isolados em MM + II-G e MM + II-H não foi considerado.