

MÉTODOS DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS VIÁVEIS EM PLACA

INTRODUÇÃO:

A determinação de populações de micro-organismos em análises chamadas de “quantitativas” é largamente empregada no controle da qualidade de diferentes materiais, tais com: água potável, água do mar, água de rios, água de efluentes....), medicamentos, cosméticos e alimentos. A quantidade de micro-organismos encontrada permite, muitas vezes, avaliar diferentes aspectos relacionados a qualidade desses materiais, por exemplo:

- Em amostras de água a população microbiana está relacionada a eficácia do processo de cloração, a presença de compostos orgânicos (nutrientes), ...;
- Em amostras de medicamentos e cosméticos a população microbiana está relacionada com a qualidade das matérias primas, das condições de manipulação durante a produção, a eficácia de sistemas preservativos (antimicrobianos adicionados para “auto-conservação dos produtos”), ...;
- Em amostras de alimentos a população microbiana está relacionada com as condições de produção e conservação, a eficácia de conservantes, aos processamentos térmicos,;

Estas análises quantitativas podem abranger:

- Grupos genéricos de micro-organismos: Contagem de Bactérias Aeróbias e/ou Facultativas, Mesófilas Viáveis, Contagem Total de Fungos Filamentosos e Leveduras Viáveis, ...;
- Grupos específicos de micro-organismos: Contagem de Estafilococos do Grupo Coagulase Positiva; Contagem de Clostrídios Sulfito Redutores, Contagem de Bactérias Ácido-Láticas, Contagem de Bactérias Proteolíticas, ...;
- Espécies bacterianas: Contagem de *Staphylococcus aureus*, Contagem de *Bacillus cereus*, ...;

A população bacteriana pode ser indicativa da qualidade da amostra analisada. Por exemplo, na **Contagem de Bactérias Heterotróficas** da água de consumo (clorada) é recomendável que um valor limite (“Valor Máximo Permitido = **VMP**”) de 500 ufc/mL. Neste caso, existe uma relação direta entre a presença de matéria orgânica e o tamanho da população bacteriana na água – quanto mais matéria orgânica, mais nutrientes e maior a inativação do cloro, o que propicia a multiplicação bacteriana permitindo a geração de populações elevadas.

Em algumas situações na análise de alimentos o VMP de um microrganismo esta relacionado com a populações bacteriana necessária para produção de toxina capaz de desencadear uma intoxicação alimentar. Por exemplo, a **Contagem de *Staphylococcus aureus*** e a **Contagem de *Bacillus cereus*** (emético) em alimentos, em geral só se correlaciona com surtos de intoxicação alimentar quando atinge valores de 10^5 ufc/g.

Os **Métodos de Contagem Viáveis em Placa**, seja para grupos genéricos/específicos de bactérias ou espécies bacterianas, geralmente empregam as a **Técnica do Pour-Plate** e a **Técnica de Spread-Plate (Espalhamento em Superfície)**.

O objetivo desta aula prática é o aluno executar estas duas técnicas, comparar os seus resultados e identificar suas vantagens e desvantagens.

PROCEDIMENTO:

PREPARO DA DILUIÇÃO SERIADA:

Inicialmente o aluno irá preparar uma diluição seriada na razão 1/10 da amostra em análise. Como diluente será utilizado Água Peptonada Tamponada 0,1%.

- Homogeneizar por agitação a amostra em análise;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 mL (1.000 microlitros) para um tubo com 9 mL de Água Peptonada Tamponada identificado com: 10^{-1} ;
- Homogeneizar por agitação o conteúdo do tubo da diluição 10^{-1} ;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 mL (1.000 microlitros) para um tubo com 9 mL de Água Peptonada Tamponada identificado com: 10^{-2} ;
- Homogeneizar por agitação o conteúdo do tubo da diluição 10^{-2} ;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 mL (1.000 microlitros) para um tubo com 9 mL de Água Peptonada Tamponada identificado com: 10^{-3} ;
- Homogeneizar por agitação o conteúdo do tubo da diluição 10^{-3} ;

CONTAGEM DE BACTÉRIAS VIÁVEIS PELA TÉCNICA DO POUR-PLATE:

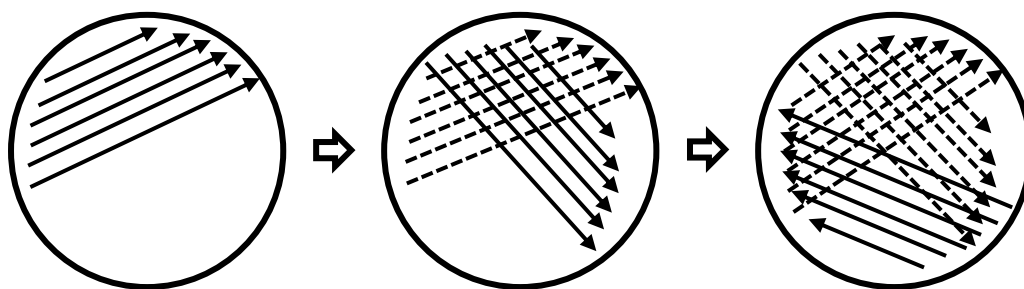
- Homogeneizar por agitação o conteúdo dos tubos das diluições 10^{-1} a 10^{-3} ;
- Identificar 3 (três) placas de Petri com o **número do aluno** e os **valores da diluição seriada**;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 mL (1.000 microlitros) da diluição 10^{-1} para o fundo de uma Placa de Petri estéril com identificação correspondente;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 mL (1.000 microlitros) da diluição 10^{-2} para o fundo de uma Placa de Petri estéril com identificação correspondente;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 1 mL (1.000 microlitros) da diluição 10^{-3} para o fundo de uma Placa de Petri estéril com identificação correspondente;
- Adicionar assepticamente nas placas 17 a 20 mL de Ágar Padrão para Contagem em Placa, fundido e resfriada a 45-50°C;

- Homogenizar o conteúdo das placas fazendo movimentos sobre um “8” imaginário em uma superfície plana;
- Esperar o meio solidificar;
- Incubar as placas na posição invertida na estufa a 35°C por 48 h;
- Fazer a leitura dos resultados contando o número de colônias em cada placa;
- Determinar a Contagem de Bactérias, em **ufc/mL** pela fórmula:

Número de Colônias	x	Inverso da Diluição	x	Fator de Correção de Volume para mL
--------------------	---	---------------------	---	-------------------------------------

DETERMINAÇÃO DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS VIÁVEIS PELA TÉCNICA DO SPREAD-PLATE:

- Homogeneizar por agitação o conteúdo dos tubos das diluições 10^{-1} a 10^{-3} ;
- Identificar 3 (três) placas de Petri de Ágar Padrão para Contagem em Placa com o **número do aluno** e os **valores da diluição seriada**;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 0,1 mL (100 microlitros) da diluição 10^{-1} para a superfície do meio de cultura da placa com identificação correspondente;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 0,1 mL (100 microlitros) da diluição 10^{-2} para a superfície do meio de cultura da placa com identificação correspondente;
- Transferir, com auxílio de um micropipetador/ponteira estéril, um volume de 0,1 mL (100 microlitros) da diluição 10^{-3} para a superfície do meio de cultura da placa com identificação correspondente;
- Espalhar, com auxílio de uma alça de Drigalski ou instrumento similar, o inoculo da placa fazendo movimentos em três direções como indicado abaixo



- Esperar o meio solidificar;
- Incubar as placas na posição invertida na estufa a 35°C por 48 h;
- Fazer a leitura dos resultados contando o número de colônias em cada placa;
- Determinar a Contagem de Bactérias, em **ufc/mL** pela fórmula:

Número de Colônias	x	Inverso da Diluição	x	Fator de Correção de Volume para mL
--------------------	---	---------------------	---	-------------------------------------