

O NÚMERO DE BACTÉRIAS

A CONTAGEM EM PLACAS

A contagem em placas é um dos métodos mais utilizados para determinar qual o número de microrganismos viáveis em um meio líquido.

Quando a concentração é baixa, procede-se à uma filtração da amostra através de uma membrana que será levada ao meio de cultura, em uma placa de Petri. Os microrganismos retidos na membrana se desenvolverão formando colônias, possibilitando a quantificação.

Quando a concentração é alta, procede-se à preparação de diluições seriadas em uma sequência de 1:10, chegando a diluições de 10^{-7} ou mais. Pequenas alíquotas dessas diluições são semeadas no meio nutriente das placas, onde as bactérias se desenvolverão formando colônias.

Nas placas em que a concentração da alíquota semeada for muito alta, as bactérias formarão um tapete, mas se a concentração for muito baixa, o número de colônias pode ser muito baixo. Entre os dois extremos, alguma das placas apresentará um número de colônias compreendido entre 20 e 300, permitindo a quantificação.

Como esta técnica demanda muito material, consideramos que uma simplificação como a de Wymer pode ser muito útil no laboratório de ensino.

BIBLIOGRAFIA

MALAJOVICH M.A. Atividades práticas - Trabalhar em segurança. Guia nº 67, www.bteduc.bio.br

VERMELHO A.B. *et al.* Práticas de Microbiologia. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2006

WYMER P. Practical Microbiology and Biotechnology for Schools. London, McDonald & Co., 1987.

TITULAÇÃO / O NÚMERO DE BACTÉRIAS

ATIVIDADE PRÁTICA

OBJETIVO

Determinar o número de microrganismos de uma cultura bacteriana.

MATERIAIS

Cultura de *Escherichia coli*, preparada no dia anterior e diluída a 10^{-4} pouco antes da aula, 1 placa de Petri contendo meio nutriente, 5 tubos de ensaio com 4,5 mL de solução salina estéril, 1 pipeta de 1 mL, 1 pipeta Pasteur, recipiente de descarte com desinfetante, fita adesiva, *pilot*, estufa a 37^o C.

Antes de começar, verificar a ausência de água de condensação na placa de Petri. Em caso contrário ver o Guia nº 81.

PROCEDIMENTO



Seguir as normas de trabalho *standard* (Ver Guia nº 67). Todo o procedimento deve ser desenvolvido em condições assépticas.

A. PREPARAÇÃO DE UMA SÉRIE DE DILUIÇÕES

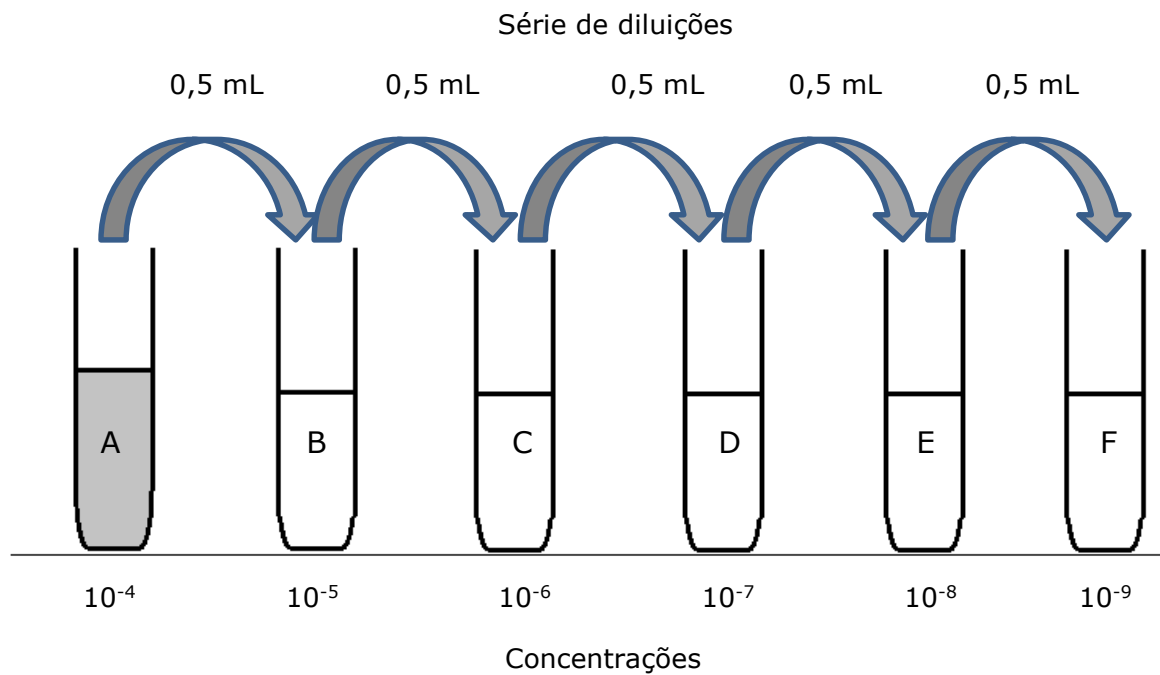
Transferir 0,5 ml da suspensão bacteriana de um tubo ao seguinte, iniciando o procedimento a partir do tubo com a suspensão bacteriana de concentração 10^{-4} . Um esquema geral dos passos a seguir se encontra representado na Figura 1.

Entre uma diluição e a outra, misturar bem o conteúdo dos tubos, mexendo-os por rotação.



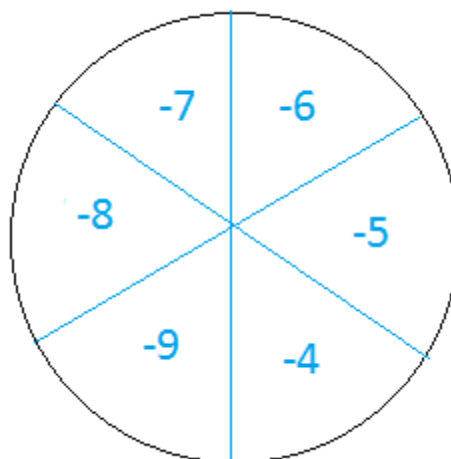
TITULAÇÃO / O NÚMERO DE BACTÉRIAS

Figura 1: Preparação da série de diluições



B. ROTULADO DA PLACA

Dividir a placa em 6 setores, como representado no esquema abaixo.



TITULAÇÃO / O NÚMERO DE BACTÉRIAS

C. SEMEADURA

1. Retirar com a pipeta Pasteur uma pequena quantidade de líquido do tubo F, de concentração 10^{-9} (diluição 10^9).
2. Abrir a placa de Petri e deixar cair uma gota no setor rotulado -9.
3. Fechar a placa e devolver o excesso de líquido ao tubo F.
4. Repetir os passos anteriores com os tubos E, D, C, B e A.
5. Descartar a pipeta, no recipiente com desinfetante.
6. Fechar a placa e incubar a temperatura adequada durante 24-48 horas.

RESULTADOS

Observar a placa e procurar um setor onde possam ser diferenciadas entre 10 e 20 colônias.

1. Calcular quantas vezes a cultura A foi diluída nessa gota.
2. Baseando-se no número de colônias e na diluição correspondente, calcular a concentração de microrganismos no tubo A.

Dica: Estima-se que uma pipeta calibrada 1 mL de líquido contém 20 gotas.

3. A diluição do cultivo original foi realizada com uma única pipeta, partindo do tubo mais concentrado em direção ao tubo menos concentrado. Na semeadura, invertemos esse sentido. Quais os erros introduzidos por esses procedimentos?

TITULAÇÃO / O NÚMERO DE BACTÉRIAS

NOSSO COMENTÁRIO

As atividades práticas de titulação demandam uma quantidade muito grande de material, o que muitas vezes as torna inviáveis no laboratório de ensino.

Este protocolo, extraído do livro de Wymer "Practical Microbiology and Biotechnology for Schools", resulta bem interessante, porque permite introduzir o procedimento de um modo mais simples. Contudo, exige alguma experiência prévia e bastante habilidade manual.

Os resultados podem ser vistos na Figura 1.

COMO MONTAR UM PROJETO

A técnica pode ser aplicada para determinar a concentração de microrganismos na água ou ao longo de uma fermentação, sempre e quando se utilizem os meios de cultura correspondentes.

TITULAÇÃO / O NÚMERO DE BACTÉRIAS

Figura 1: Titulação de um cultivo de *Escherichia coli*.

