UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PROJETO DESPERTANDO PARA A CIÊNCIA

OFICINA DE MICROBIOLOGIA

Contagem Padrão em Placas (Aeróbios Mesófilos)

Profª. Drª: Mareci Mendes de Almeida

Profª. Drª: Nelci Catarina Chiquetto

Profª. Drª: Lara Tschopoko Pedroso Pereira

Lorena Rodrigues Ramos

PONTA GROSSA

2015

ATIVIDADE PRÁTICA

Contagem padrão em placas (mesófilos aeróbios)

Micro-organismos mesófilos aeróbios crescem em temperaturas de 35°C a 37°C.

Materiais

- Leite pasteurizado;
- Micropipeta 1ml;
- Ponteiras;
- Pipeta graduada 10ml;
- Tubos de ensaios com tampas de rosca;
- Placas de Petri;
- Erlenmeyer;
- Proveta 250ml;
- Potes com tampas;
- Becker;
- Bico de Busen;
- Autoclave;
- Estufa 35°C
- Ágar PCA;
- Água peptonada.

Procedimentos

Devem-se seguir as normas de segurança do laboratório: jaleco de mangas longas e touca. A desinfecção da bancada é feita com solução de álcool em água a 70% (v/v). Toda a prática deve ser realizada em proximidade ao bico de Bunsen para evitar contaminação. Portanto, acender os bicos no mínimo 10 minutos antes do início do procedimento.

Preparação dos meios e materiais

- Preparo da água peptonada:
  1g por litro de água (0,1%). Distribuir 9 mL em tubos de ensaio. Fechar com tampão de algodão (proteger os tampões com papel) ou com rosca que não deve ser fechada totalmente.

- Preparo do ágar PCA (*Plate count Agar)*:
  23,5g por litro de água destilada.Aquece-se até dissolução completa.

Os meios e a vidraria necessária deverão ser esterilizados em autoclave a 121^{o}C durante 15 minutos.

Preparo da amostra

Esterilizar a embalagem do material a ser analisado com algodão embebido em álcool 70%. No caso de alimento líquido agitar ou inverter o recipiente com a amostra 25 vezes. Abrir a embalagem e pipetar assepticamente uma alíquota da amostra em um recipiente estéril.

Preparo da diluição

Nos potes com 225ml de água peptonada, adicionar 25ml de amostra (leite);
Nos tubos com 9ml de água peptonada, adicionar 1 ml da diluição anterior.

Preparar as diluições necessárias, 10^{-2} e 10^{-3} a partir da diluição 10^{-1}. A amostra 10^{-1} é preparada adicionando-se25ml de amostra em 225ml de água peptonada. As soluções seguintes são preparadas da seguinte forma: para a de diluição 10^{-2}, adiciona-se 1 mL da solução 10^{-1} e 9 mL de água peptonada, e assim do mesmo modo com a próxima. Na Figura 1 observa-se um esquema dessas diluições e do posterior plaqueamento.

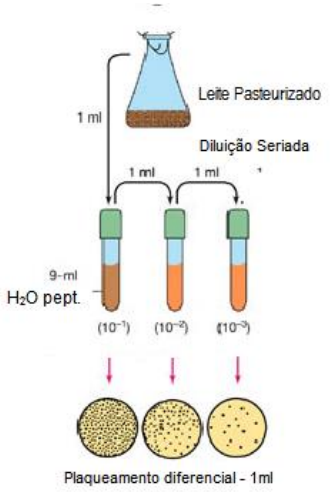


Figura 1. Esquema das diluições a serem feitas e do posterior plaqueamento.

Plaqueamento

O Ágar após esterilizado pode ser plaqueado, deixando antes resfriar um pouco até em torno de 45 ºC. Se esta etapa for feita depois o Agar quando frio ficará no estado sólido. Para realização da prática, deve-se tornar o mesmo líquido. Liquefaz-se o Ágar em banho-maria. Deixa-se equilibrar a temperatura até 45ºC, pois temperaturas muito altas levarão os micro-organismos à morte. Distribuir 1,0 mL de cada diluição no centro de placas de Petri estéreis e verter aproximadamente 15ml de ágar PCA; fazer movimentação em oito com a placa; esperar esfriar; incubar as placas invertidas (para evitar a formação de vapor de condensação sobre o meio de cultura) a 35°C de 24-48 horas. Essa técnica é chamada de semeadura “Pour Plate”.

Obtenção de resultados

- Serão consideradas significativas as contagem das diluições que apresentam entre 30 a 300 colônias;
- (resultado da contagem x diluição da placa contada = UFC/ml)

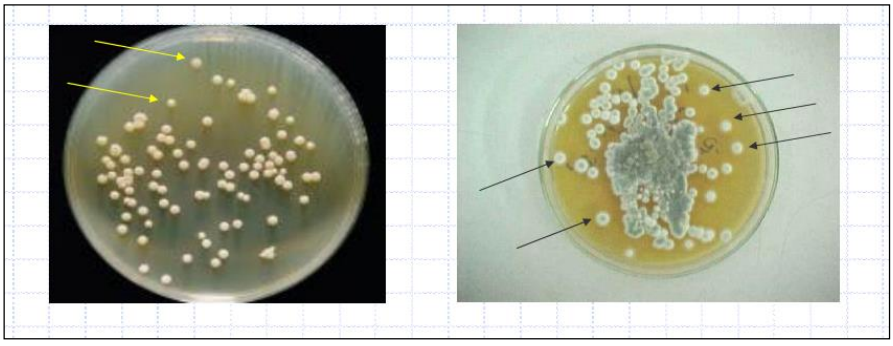


Figura 2. Aspectos das colônias de micro-organismos esperadas em uma amostra de leite.

No meio sólido, é de se esperar que cada célula viável dê origem a uma colônia. Após o período de incubação, devem-se analisar os resultados obtidos, com base nas colônias formadas na placa. Através do contador de colônias, quantifica-se a quantidade de colônias presentes na placa.

Interpretação dos resultados

A maioria dos alimentos industrializados (exceto, por exemplo, alimentos fermentados) deve ser considerada inadequada para o consumo quando contém um grande número de micro-organismos, mesmo quando estes não sejam conhecidos como patógenos e não haja alteração de forma apreciável nos caracteres organolépticos do alimento, segundo a Comissão Internacional de Padrões Microbiológicos para Alimentos (I.C.M.S.F.).
De acordo com a legislação brasileira, a contagem padrão de placas de leite não deve exceder $4{,}0 \times 10^4$ (UFC/mL). Se a contagem encontrada para o leite pasteurizado for acima de 4×10^4 UFC/mL, o leite encontra-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.