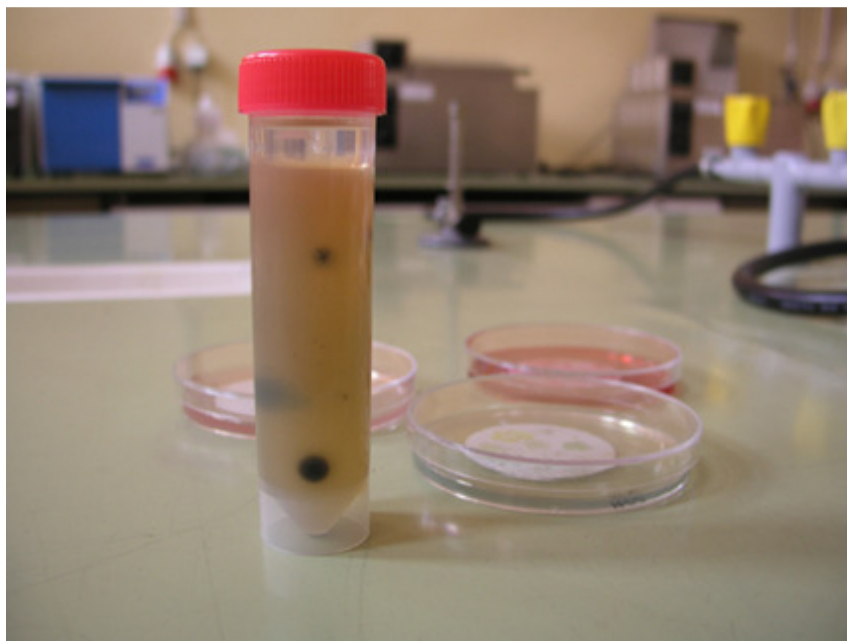


Análise Bacteriológica de Águas. Pesquisa, Confirmação e Determinação do Número de Clostrídios Sulfito Redutores



Objectivos

Pesquisar, confirmar e determinar o número de clostrídios sulfito redutores em 20 ml de uma amostra de água.

Informação

Os clostrídios sulfito redutores são bactérias de morfologia bacilar, Gram positivas, anaeróbias estritas, capazes de formar esporos e com actividade sulfito redutora.

O método baseia-se em contar o nº de colónias de bactérias, formadas dos esporos, com capacidade sulfito redutora.

O volume de água a analisar é de 20 ml. A amostra é submetida a um tratamento térmico de 80°C durante 10 min. Este tratamento tem como objectivo inactivar as células microbianas vegetativas, permanecendo viáveis os esporos.

A inoculação faz-se por incorporação do volume da amostra em igual volume de meio de cultura. Para não diluir o meio, este deve ter concentração dupla.

A anaerobiose é conseguida pela presença do Agar do meio e pela adição de parafina líquida.

Material

- Amostra de água
- Álcool
- Pipeta de 20 ml estéril
- Balança
- Matrizes

- Placa de aquecimento e agitação
- Autoclave ou panela de pressão
- Papel de limpeza
- Banho termóstato
- Meios de cultura desidratados - ML Agar (Meat Liver Agar) e Litmus Milk
- Espátula
- Parafina líquida estéril
- Proveta graduada
- Estufas de incubação
- Caneta de acetato
- Frascos de esterilização
- Bico de Bunsen ou lamparina de álcool
- Tubo de ensaio de 50 ml estéril

Preparação dos meios de cultura

ML Agar (Meat Liver Agar)

Para o volume de meio pretendido, pesar para um matraz 2 vezes (concentração dupla) a massa de meio desidratado segundo as especificações do fabricante.

Adicionar ao matraz o volume de água destilada, correspondente à massa de meio pesada.

Com agitação levar o meio à fervura na placa de aquecimento, até que todos os ingredientes do meio se dissolvam.

Verter o meio para o frasco de esterilização e levar ao autoclave à temperatura de 121°C durante 20 min.

Após esterilização arrefecer meio a 50°C no banho termóstato. Não deixar solidificar.

Litmus Milk

Para o volume de meio pretendido, pesar para um matraz a massa de meio desidratado segundo as especificações do fabricante.

Adicionar ao matraz o volume de água destilada, correspondente à massa de meio pesada.

Com agitação dissolver todos os ingredientes do meio.

Distribuir o meio por tubos de ensaio medindo 10 ml para cada.

Levar os tubos ao autoclave à temperatura de 110°C durante 10 min. Uma temperatura muito elevada de esterilização degrada os nutrientes do meio.

Procedimento experimental

1- Medir com pipeta estéril 20 ml de água a analisar para um tubo de ensaio estéril.

2- Aquecer em banho termóstato a 80°C durante 10 minutos, deixar arrefecer até cerca de 50°C.

3- Adicionar assépticamente (sem incorporação de ar) 20 mL de Meat Liver Agar (concentração dupla) preparado e mantido a 50°C. Homogeneizar por inversão (uma só vez) e deixar solidificar com o tubo na posição vertical. Cobrir a superfície do Agar com parafina estéril. Incubar a 37°C durante 5 dias.

4- O aparecimento de colónias negras indica a presença de esporos de clostrídios sulfito redutores.

5- Contar o nº de colónias negras e exprimir o resultado em n.º de esporos de clostrídios sulfito redutores/20

mL de água analisada.

Nota: É indispensável a leitura às 24 horas, em presença de numerosas colónias verifica-se uma difusão dos halos e o aparecimento de uma coloração negra uniforme impossibilitando a contagem às 48 horas.

6- Repicar assépticamente as colónias suspeitas (de cor negra) do meio de Meat Liver Agar para tubo de ensaio contendo Litmus Milk. Incubar a 37°C até 5 dias.

7- O aparecimento de uma reacção de coagulação confirma a presença de *Clostridium perfringens*. O resultado é apresentado, "n.º colónias de *Clostridium perfringens* por 20 ml de água"

Última Actualização: 2004/07/09