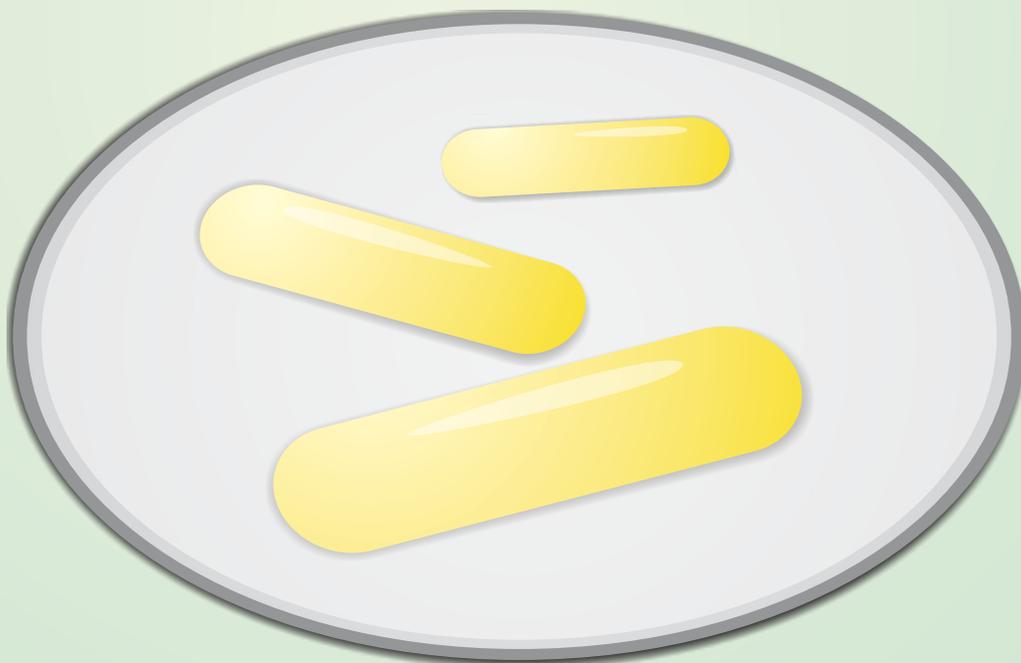


CURSO TEÓRICO E PRÁTICO

**QUANTIFICAÇÃO E  
IDENTIFICAÇÃO DE**  
*Bacillus subtilis e  
Bacillus licheniformis*



25 e 26 de abril 2012

**Local**

Embrapa Meio Ambiente  
Rod. SP 340 - km 127,5  
Tanquinho Velho  
Jaguariúna, SP

APOIO

**CHR HANSEN**  
Improving food & health

REALIZAÇÃO

**FUNARBE**  
Fundação de Apoio à Universidade Federal de Viçosa

**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

**II - CURSO TEÓRICO E PRÁTICO**  
**QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE**  
***Bacillus subtilis* E *Bacillus licheniformis***

Um dos atuais problemas do controle biológico de doenças e pragas é a padronização de metodologias para avaliação da conformidade de produtos contendo agentes de biocontrole. Para o controle biológico de doenças de plantas, bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os organismos mais explorados, com diversos produtos comerciais.

O curso tem como objetivo treinar profissionais para a quantificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Faz parte do projeto “Desenvolvimento de metodologia analítica e amostral para avaliação de conformidade e da inocuidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos de biocontrole”, financiado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e CNPq.

## **PROGRAMAÇÃO**

**25/04/2012**

8h30 - Aspectos gerais sobre *Bacillus subtilis* como agente de controle biológico de doenças de plantas - *Wagner Bettiol*

9h - Importância da padronização de metodologias para avaliação da conformidade de produtos contendo agentes de biocontrole – *Marcelo A. B. Morandi*

9h30 - Metodologia para quantificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* - *Ligia Godoi* e *Zayame V. Pinto*

10:30h – Intervalo

11:00h -Preparo dos meios para quantificação e identificação - *Ligia Godoi, Zayame V. Pinto, Cleusa M. M. Lucon, Elen Ribeiro dos Santos Agostini, Rosely Nascimento, Márcia Maria Parma.*

12:00h –almoço

14:00h - Montagem dos ensaios para a quantificação - *Ligia Godoi, Zayame V. Pinto, Cleusa M. M. Lucon, Elen Ribeiro dos Santos Agostini, Rosely Nascimento, Márcia Maria Parma.*

15:30h – intervalo

16:00h – Continuação da montagem dos ensaios para a quantificação - *Ligia Godoi, Zayame V. Pinto, Cleusa M. M. Lucon, Elen Ribeiro dos Santos Agostini, Rosely Nascimento, Márcia Maria Parma.*

**26/04/2012**

9h - Quantificação de *Bacillus* -*Ligia Godoi, Zayame V. Pinto, Cleusa M. M. Lucon, Elen Ribeiro dos Santos Agostini, Rosely Nascimento, Márcia Maria Parma.*

10:30h – intervalo

11:00h - Cálculo da variabilidade da quantificação – *Marcelo A. B. Morandi*

12:00 h - almoço

14:00h – Avaliação da metodologia - *Ligia Godoi, Zayame V. Pinto, Cleusa M. M. Lucon, Elen Ribeiro dos Santos Agostini, Rosely Nascimento, Márcia Maria Parma.*

15:30h-intervalo

16:00 h - Discussão das dificuldades e da metodologia – *Wagner Bettiol, Marcelo Morandi, Zayame V. Pinto, Cleusa M. M. Lucon e Ligia Godoi*

17:00 h – Encerramento

# **METODOLOGIA PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE *Bacillus*.**

## **1. PRINCÍPIO**

Este é um método quantitativo, onde o resultado é expresso como UFC/g. Uma ou mais amostras são homogeneizadas com o diluente esterilizado (água peptonada) e a partir disto, uma nova diluição é preparada para cada amostra e tratada termicamente a  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 minutos. Diluições decimais são preparadas a partir das amostras tratadas termicamente, espalhadas nas placas sobre o meio e incubadas.

## **2. APLICAÇÃO**

Aplicável aos produtos que possuem em sua composição células de *Bacillus*.

## **3. AMOSTRAGEM**

A amostra encaminhada para análise deverá estar em embalagem comercial lacrada, contendo as seguintes informações: formulação, concentração do ingrediente ativo, número do lote, data de fabricação, data de validade, nome do produto, nome da empresa, responsável técnico, ingrediente ativo e inerte, bem como a forma de armazenamento. No laboratório, as amostras podem ser armazenadas a temperatura ambiente ou, preferencialmente, em geladeira ou câmara fria. As amostras nunca devem ser congeladas. Deve-se tomar as amostras de acordo com os princípios microbiológicos estabelecidos. Desta forma, as amostras serão representativas do produto a ser analisado.

## **4. EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS**

- Câmara de fluxo laminar;
- Bico de Bunsen ou lamparina;
- Fósforo;
- Papel toalha;
- Etanol 70%;
- Hipoclorito 2% de ingrediente ativo;
- Erlenmeyer com capacidade para 250 mL;
- Tubos de ensaio com capacidade de 25 mL;
- Tampas para tubo de ensaio;
- Estante para tubos de ensaio;
- Autoclave calibrada;
- pH-metro calibrado;

- Balança semi analítica com faixa de trabalho de 1 a 2000 g;
- Agitador de tubo de ensaio;
- Banho de ultrassom com frequência de 40 kHz;
- Incubadora operando  $37 \pm 2$  °C (BOD);
- Banho-maria operando  $45 \pm 2$  °C e  $80 \pm 2$  °C;
- Micropipeta de 10 mL, 100 µL e 1000 µL;
- Ponteiros estéreis para micropipeta de 10 mL, 100 µL e 1000 µL (de preferência com filtro);
- Placas de Petri descartável estéreis;
- Alças de Drigalski descartáveis estéreis (ou de vidro);
- Agitador magnético com aquecimento;
- Barra magnética – imã para aquecedor magnético.

## **5. DILUENTES**

### **5.1 Água Peptonada**

Ingredientes:

- Peptona de caseína: 15,0 g (pode ser substituído por 15,0 g de Tryptone)
- NaCl: 9,0 g
- Água destilada: 1000 mL

Preparo:

Em frasco de Erlenmeyer suspender os ingredientes (peptona de caseína e NaCl) em 1000 mL de água destilada. Misturar completamente em agitador magnético aquecendo até o ponto de ebulição sob frequente agitação. Autoclavar o diluente a 121 °C por 15 minutos em autoclave. Antes do processo de autoclavagem, acertar o pH para  $7,0 \pm 0,2$ , com HCl ou NaOH quando necessário.

O diluente mantém as características por seis meses se mantido sob refrigeração (2-8 °C).

## **6. MEIO DE CULTURA**

### **6.1 Nutriente Agar (NA)**

Ingredientes:

- Nutriente Agar: recomendação do fabricante;
- Água destilada: 1000 mL.

Preparo:

Em frascos de Erlenmeyer misturar a água destilada ao meio de Nutriente Agar e autoclavar a 121 °C a 1 atm por 20 minutos. Verter aproximadamente 20 mL do meio

por placa descartável esterilizada. Depois de solidificado o meio, as placas devem ser invertidas e incubadas a  $37 \pm 2$  °C por uma noite para secar e para avaliar a condição de esterilidade do meio. As placas preparadas com NA podem ser estocadas em local escuro e sob refrigeração (2-8 °C) por sete dias.

Observação: todas as vidrarias e soluções devem ser esterilizadas em autoclave antes de serem utilizadas.

## 7. PROCEDIMENTO

7.1 As amostras a serem testadas devem ser colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise.

7.2 Pesar 10 g do produto a ser testado em Erlenmeyer e adicionar, por pesagem, 90 g de água peptonada (será a diluição  $10^{-1}$ ).

7.3 Colocar o Erlenmeyer com o produto e a água peptonada em ultrassom sem aquecimento durante 5 minutos. Após, colocar uma barra magnética e agitar a suspensão formada na intensidade 7 do agitador magnético por 1 min.

7.4 Utilizar uma micropipeta estéril para transferir 1,0 mL da diluição  $10^{-1}$ , para cada um dos dois tubos com 9,0 mL de água peptonada.

7.5 Misturar o conteúdo do tubo em agitador para tubo de ensaio colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhamento.

7.6 Tratar termicamente os tubos em um banho-maria a  $80 \pm 2$  °C por 12 minutos

7.7 Resfriar os tubos em banho gelado (água + gelo) por 10 segundos.

7.8 Preparar diluições decimais de cada um dos tubos tratados termicamente, transferir 1,0 mL do conteúdo, para outro tubo com 9,0 mL de água peptonada.

7.9 Misturar o conteúdo dos tubos em agitador de tubo de ensaio, como no item 7.5.

7.10 Repetir os itens 7.8 e 7.9, utilizando a última diluição preparada, até alcançar a diluição apropriada. A diluição apropriada para produtos com  $10^{10}$  UFC/g é  $10^{-8}$ , para  $10^9$  é  $10^{-7}$  e assim por diante (Tabela 1). Para cada diluição trocar a ponteira da micropipeta.

**Tabela 1.** Diluição utilizada para plaqueamento em meio Nutriente Agar.

Informação do fabricante	Diluição apropriada
$10^5$	$10^{-3}$
$10^6$	$10^{-4}$
$10^7$	$10^{-5}$
$10^8$	$10^{-6}$
$10^9$	$10^{-7}$
$10^{10}$	$10^{-8}$
$10^{11}$	$10^{-9}$
$10^{12}$	$10^{-10}$

7.11 Transferir da diluição apropriada, com uma micropipeta estéril, 0,1 mL para a superfície de cinco placas de Petri com NA.

7.12 A diluição é espalhada sobre a superfície com uma alça de Drigalski estéril, imediatamente após a transferência. Para cada grupo de cinco placas utilizar uma alça de Drigalski.

7.13 Fazer uma placa controle antes de iniciar o item 7.2, espalhando em placa com meio NA 0,1 mL de diluente com alça de Drigalski esterilizada.

7.14 Deixar a amostra ser absorvida pelo meio por 2 minutos antes de inverter as placas e incubar a  $37 \pm 2$  °C por 17-20 horas

## 8. REPETIÇÃO

Devem ser feitas duas pesagens do produto (item 7.2). De cada pesagem devem ser feitas duas diluições seriadas (item 7.4) e plaquear cinco repetições da diluição apropriada por pesagem (7.11).

## 9. CONTAGEM DE COLÔNIAS

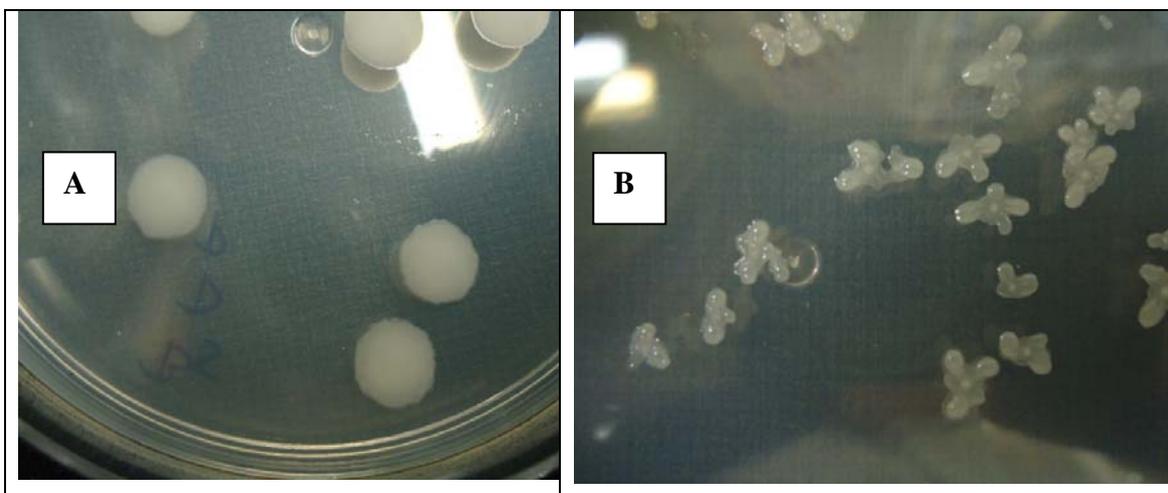
Após 17 - 20 horas fazer a contagem do número de colônias por placa, segundo a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{número médio de colônias nas placas} \times \text{diluição escolhida da amostra} \times 10^*$$

\* este 10 refere-se ao fato de terem sido plaqueados apenas 100 µL de suspensão.

Observação: Ideal é que cada placa tenha de 30 a 300 colônias.

Outra sugestão é a utilização da “Planilha *Bacillus*” para o cálculo da unidade formadora de colônia, desenvolvida no âmbito do projeto Qualibio. A planilha permite uma maior facilidade e precisão nas análises (Tabela 2).



**Figura 1.** Diferenciação visual das colônias de (A) *Bacillus subtilis* e (B) *B. licheniformis*.

**Tabela 2.** Planilha *Bacillus* para cálculo da unidade formadora de colônia.

<b>PLANILHA PARA CÁLCULO DE UFC DE <i>Bacillus</i> s.</b> <b>Instruções gerais:</b> 1. Células em amarelo: informações de controle 2. Células em azul: entrada de dados											
							Controle insumos				
Análise nº:			Método de análise:			Diluyente (frascos):					
Produto:			Tamanho amostra:	10 g		Diluyente (tubos):					
Amostra nº:			Primeira diluição (agitador):	-1		NaOH:					
Tipo:						Agar:					
Data:											
Referência nº:											
Data de aprovação:			Diluição usada para plaqueamento:			Pipeta nº:					
<b>1. pesagem</b>					<b>2. pesagem</b>						
A			bac1	bac2	Total	C			bac1	bac2	Total
Soma			0	0	0	Soma			0	0	0
Média			#DIV/0!	#DIV/0!		Média			#DIV/0!	#DIV/0!	
B						D					
Soma			0	0	0	Soma			0	0	0
Média			#DIV/0!	#DIV/0!	0	Média			#DIV/0!	#DIV/0!	0
CHI² <sub>1,999999</sub> :			#DIV/0!	< 3,8 ?	#DIV/0!	CHI² <sub>1,999999</sub> :			#DIV/0!	< 3,8 ?	#DIV/0!
<b>Media</b>			0	0	0	<b>Média</b>			0	0	0
<b>CFU<sub>1,999999</sub>:</b>			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	<b>CFU<sub>1,999999</sub>:</b>			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
<b>Resultado final para duas pesagens</b>											
			bac1	bac2	CFU	Esperado	DIFF, %				
Média CFU			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!				
Desvio Padrão			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!				
95% intervalo confiança +/-			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!				

## 10. PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS APÓS A ANÁLISE E DESCARTE

Logo após as análises, as amostras deverão ser lacradas novamente e preservadas conforme orientação do fabricante (rótulo, bula) até a data de validade, caso haja necessidade de repetição dos procedimentos. Após este período ou, se não houver mais interesse nas amostras, as mesmas deverão ser autoclavadas a 120 °C por 20 minutos, e em seguida descartadas como lixo orgânico.

## 11. LIMPEZA

Antes de realizar e após o término da metodologia, a câmara de fluxo laminar (ou o local onde será realizado o procedimento) deverá ser limpo com papel toalha embebido em hipoclorito 2 % e depois em álcool 70 %.

Quando utilizar a alça de Drigalski de vidro, mergulhar a alça em hipoclorito 2 % por 5 segundos, depois por mais 5 segundos em álcool 70 % e flambar por mais 5 segundos em fogo, repetir o procedimento por três vezes. Esfriar a alça colocando a base na parte

superior da placa. Para cada grupo de cinco placas repetir o processo de limpeza da alça de Drigalski. Depois do uso, deixar a alça durante 24 h mergulhada em suspensão de hipoclorito 2 %.

## 12. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

LEUSCHNER, R.G.K.; BEW, J. Enumeration of probiotic *Bacillus* spores in animal feed: interlaboratory study. **Journal of AOAC international**. V.8, n.6, 2003.

APOIO



REALIZAÇÃO



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

