



CÓPIA NÃO CONTROLADA



PE-2P&amp;D-01570    Versão A

Padrão ATIVO

**TÉCNICA MICROBIOLÓGICA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE  
MICROORGANISMO - BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDOS(BPA)**

Aprovado por Leonardo Suhett de Souza/BRA/Petrobras (CENPES/PDIDMS/PPL/LABP) em 5 de abr de 2021 | Gerido por CENPES/PDIDMS/PPL/LABP

**CADASTRO**Tipo

PE - Padrão de Execução

Nível

Nível 2 - Área / Gerência Executiva

Sigla

P&amp;D

Abrangência desse Padrão

CENPES - Pesquisa e Desenvolvimento

Aprovador

CENPES/PDIDMS/PPL/LABP

ANP

Não

Outros FiltrosInstalaçãoPalavras-chaveEscopo da Certificação/Sistema de GestãoRequisitoMacroprocesso

Gerir Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

Processo

Realizar ensaios de biotecnologia

Responsável Padronização

RH/DO/CLTG

**VALIDAÇÃO****Padrão entrou em validação em 25/07/2017. Prazo para validação: 45 dias (até )**

Nome	Status	Data da Validação
------	--------	-------------------

## 1. OBJETIVO

Este padrão tem por objetivo aplicar técnica microbiológica para detecção e quantificação de bactérias produtoras de ácidos (BPA) em meio sólido e líquido.

## 2. ABRANGÊNCIA

Laboratórios de Biotecnologia da gerência LABP.

## 3. DESCRIÇÃO

Atividade	Responsabilidade	Autoridade
Detecção de bactérias produtoras de ácidos	Técnico do laboratório	Técnico do laboratório

Através de metabolização de cadeias orgânicas mais complexas, essas bactérias, por via fermentativa, via-de-regra, ou oxidativa, produzem ácidos de cadeia curta.

Esses substratos ácidos tem ação corrosiva estimuladora anódina. Ao serem consumidos permitem a entrada de ânions agressivos, como  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{Cl}^-$  nas tubulações.

### 3.1. Materiais e Reagentes

#### 3.1.1. Materiais

- . Meio de cultura (PE-2P&D-01643-0 - Ver Nota)
- . Estufa
- . Fluxo laminar
- . Vórtex.

*Nota:* utilizar o agar-agar somente para a quantificação em meio sólido.

##### 3.1.1.1. Para quantificação em meio sólido:

- Placas de Petri
- Alça de platina
- Forno esterilizador

#### 3.1.1.2. Para quantificação em meio líquido:

- Seringas com volumes de 5,0 ou 10 mL
- Kit para detecção e quantificação de BPA, contendo 24 frascos de penicilina de 10 mL com 9 mL de meio de cultura (PE-2P&D-01643-0) e 9 frascos de penicilina com 9 mL de solução salina redutora (PE-2P&D-01620-A).

#### 3.2. Detecção em meio sólido, Técnica de Isolamento (Estriamento)

Purificação das colônias selecionadas pela técnica de estriamento em placa, que deve ser realizada em ambiente estéril e utilizando o Meio Ferro Três Açúcares (TSI) com agar-agar (PE-2P&D-01643-0).

3.2.1. Examine a placa e escolha colônias isoladas que deseja transferir;

3.2.2. Flambe a alça e deixe esfriar;

3.2.3. Toque a colônia escolhida com a ponta da alça;

3.2.4. Inocule na placa fazendo desenhos em forma de zig-zag, utilizando aproximadamente a metade da área da placa;

3.2.5. Flambe novamente a alça e deixe esfriar;

3.2.6. Divida imaginariamente a segunda metade da placa e inocule a nova parte da placa;

3.2.7. Flambe novamente a alça e deixe esfriar;

3.2.8. Inocule no restante da placa;

3.2.9. Incube a placa (em posição invertida para evitar a condensação de água sobre a superfície do meio) em estufa a 30°C por 2 dias;

3.2.10. As colônias isoladas ao longo das estrias da superfície da placa deverão alterar a coloração do meio, de acordo com as características de seus produtos metabólicos. Na tabela

abaixo (item 3.2.11.), são apresentadas as possíveis alterações da cor do meio e o seu significado;

**Nota 1:** Flambe sempre a alça de inoculação antes e depois de usá-la. Não toque, o meio ou amostra com a alça quente. Evite sacudir excessivamente a alça de inoculação.

**Nota 2:** O Meio TSI pode ser encontrado na forma desidratada.

**3.2.11. Verificação dos Resultados** - A degradação de açúcares com formação de ácidos se manifesta por uma mudança da cor do indicador de Vermelho de Fenol que vira de vermelho-alaranjado a amarelo, ou por uma virada a vermelho intenso em caso de alcalinização. O tiosulfato é reduzido por alguns microrganismos a ácido sulfídrico, o qual reage com o sal férrico produzindo sulfeto de ferro de cor negra. Neste caso o meio pode apresentar uma coloração verde escuro a quase negro.

Explicação dos Símbolos Utilizados		
A	Virada a vermelho	Produção de Alcalis
OA	Sem alteração da cor original do meio	-
S	Virada para Amarelo	Produção de ácido
SG	Virada para Amarelo e formação de gás	Produção de ácido e gás
+	Enegrecimento	Formação de H <sub>2</sub> S
-	Ausência de enegrecimento	-

### 3.3. Quantificação em meio líquido, Método do Número Mais Provável (NMP)

Número mais provável (NMP) é a técnica da estimativa da densidade bacteriana em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos obtida mediante a técnica de tubos múltiplos (Harrigan, 1998).

Nessa técnica, frascos contendo meio de cultura (TSI) e frascos com solução de diluição (solução salina redutora), são inoculados em concentrações seriadas, entre  $10^{-0}$  e  $10^{-7}$ , utilizando-se seringas estéreis (uma para cada diluição).

**3.3.1. Inocular 1 mL da amostra homogeneizada manualmente ou em vórtex, nos três frascos de**

meio de cultura da diluição  $10^{-0}$  e no frasco da diluição  $10^{-0}$  da solução salina redutora, utilizando uma mesma seringa. Prover a homogeneização;

3.3.2. Retirar 4 mL do frasco da diluição  $10^{-0}$  de solução salina redutora, transferindo 1 mL para o frasco de solução salina redutora da diluição  $10^{-1}$  e 1 mL para cada um dos três frascos da diluição  $10^{-1}$  do meio de cultura, respectivamente. Prosseguir assim até a diluição final. Os inóculos de cada diluição são feitos em triplicata, utilizando-se uma única seringa para cada diluição;

3.3.3. A incubação dos frascos de meio de cultura é realizada em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$ , por 28 dias.

3.3.4. A observação de crescimento deve ser feita diariamente, anotando-se em planilha, o crescimento positivo de cada duplicata, verificado através da mudança na coloração (ver tabela item 3.2.11).

3.3.5. Para determinação do NMP deve-se utilizar a tabela estatística (Harrigan, 1998) referida às diluições com número máximo de frascos positivos para cálculo da concentração em NMP/mL. De acordo com essa tabela, deve-se utilizar três diluições sucessivas que possam cobrir uma faixa de resultados positivos e negativos. O NMP pode ser estimado pela multiplicação do NMP derivado da tabela pelo fator de diluição da primeira diluição da faixa escolhida. Por exemplo, se a série das três diluições for 1/10, 1/100 e 1/1000, e o número de frascos positivos detectados for 3, 2 e 1, respectivamente, o valor lido na tabela é 15 e o resultado será este valor multiplicado pelo fator de diluição da 1ª diluição da faixa escolhida, e neste caso o NMP será igual a  $15 \times 10$  NMP BRS/mL.

*Nota:* Para se evitar perdas de óleo e, provavelmente, de microrganismos oleofílicos nas paredes dos frascos de diluição, durante a incubação de amostra oleosas, estas devem ser tratadas com um agente tensoativo não tóxico (p.ex. Tween 80). Uma solução de Tween 80 é adicionada sob forma de alíquota estéril, aos frascos de solução salina redutora. Para cada 9 mL de solução salina redutora, 0,2 mL de solução de tensoativo é suficiente.

### 3.4. Considerações relativas ao meio ambiente

Todos os frascos são autoclavados e lavados antes e depois de serem utilizados, segundo o PE-2P&D-01493-A (Descontaminação e lavagem de materiais).

Sobras das amostras que contenham óleo devem ser descartadas em vasilhame apropriado para

descarte oleoso, sendo enviado para descarte no SMS.

Descartar as seringas de acordo com o PE-2P&D-01473-0 (Descarte de seringas descartáveis).

Os resíduos e efluentes gerados devem ser gerenciados conforme o padrão:

. PP-2P&D-00092-0 - Plano de Gerenciamento de Resíduos do CENPES

### 3.5. Considerações relativas à saúde e segurança

Deve-se ter todo o cuidado com o manuseio da alça de platina, por que após a sua esterilização a mesma se encontra muito quente .

Após o término das análises todos os frascos e placas são autoclavados para descontaminação (PE-2P&D-01493-A - Descontaminação e lavagem de materiais).

Somente manusear o forno esterilizador após o seu resfriamento.

Utilizar os EPIs listados abaixo:

- Guarda-pó
- Sapatos de segurança
- Luvas cirúrgicas
- Óculos de segurança

Para utilização de Equipamentos de Proteção Individual, seguir as orientações apresentadas no padrão PP-2P&D-00086-0 - Gerenciamento de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's).

## 4. REGISTROS

Registro	Quem Registra	Local de Arquivamento	Como Indexar	Tempo Mínimo de Retenção
Registro laboratorial	Técnico do laboratório	Pasta relacionada à amostra	Por projeto e data	12 meses

## 5. DEFINIÇÕES

### 5.1. Definições

Autoridade - Atribuição de aprovar ou decidir

Responsabilidade - Atribuição de executar ou providenciar a execução

### 5.2. Siglas

PE - Padrão de Execução

TSI - Três Açúcares e ferro, meio de cultura seletivo para BPA

BPA - Bactérias Produtoras de Ácidos

As abreviaturas referentes às unidades organizacionais do CENPES encontram-se descritas no SINPEP/Administração do SINPEP/Órgãos.

## 6. REFERÊNCIAS

- *Laboratory Methods in food Microbiology*. 3ª edição. Editora: Academic Press, Harrigan, W. F. 1998. California USA.

## 7. ANEXOS

Tabela contendo os valores do N.M.P. para Três Tubos com Diluições Decimais Sucessivas.

Fonte: Harrigan, W. F. *Laboratory Methods in food Microbiology*. 3ª edição. Editora: Academic Press, 1998. California USA.



TABELA ESTATÍSTICA.pdf

## HISTÓRICO

Data	Ação
05/04/2021 14:44:53	Leonardo Suhett de Souza/BRA/Petrobras - Criou o documento
05/04/2021 14:47:55	Leonardo Suhett de Souza/BRA/Petrobras - Não houve alteração na forma de realizar as atividades relacionadas ao padrão nem de seus riscos e controles.

Data	Ação
05/04/2021 14:47:56	Leonardo Suhett de Souza/BRA/Petrobras - Aprovou o documento e ele se tornou "Ativo".

## SUMÁRIO DE REVISÕES

Revisão	Data	Descrição
A	25/07/2017	<p>05/04/2021 - A versão foi mantida pelo gestor do padrão devido a seleção da opção "não houve alteração na forma de realizar as atividades, nem dos riscos, controles e confiabilidade do processo". Revisão do Padrão: &lt;br&gt;&lt;br&gt;_____&lt;br&gt;</p> <p>&lt;br&gt;[08/10/2020 10:04:51] - O usuário SINPEP, Paulo Ricardo Meirelles de Freitas, executou a ação "Substituir Gestor e/ou Aprovador" a qual alterou o Gestor do padrão de CENPES/PDISO/BIO para CENPES/PDIDMS/PPL/LABP. &lt;br&gt;&lt;br&gt;Solicitação(ões) de Revisão Aprovada: &lt;br&gt; &lt;br&gt;Sugestão: &lt;br&gt;Padrão vencido. Favor enviar para o responsável pelo padrão , que é a VANESSA VOLARO - B99L. &lt;br&gt; &lt;br&gt;&lt;br&gt;Sugestão: &lt;br&gt;Padrão vencido, com análise crítica pendente. Favor enviar o mesmo para o responsável pelo padrão , que é a Vanessa Volaro - B99L. &lt;br&gt; &lt;br&gt;Sugestão: &lt;br&gt;Padrão vencido, com análise crítica pendente. Favor enviar o mesmo para o responsável pelo padrão que é o Leonardo Suhett - BT4A. &lt;br&gt;</p>
0	27/03/2017	[27/03/2017 21:11:47] - Criado a partir da migração do Padrão PE-4CE-00071-B na base SINPEP CENPES.

## ANÁLISE CRÍTICA



Data limite para análise
5 de jan de 2023

Análise crítica

Responsável análise

Data da análise crítica

## LISTA DE DISTRIBUIÇÃO

CENPES/PDIDMS/PPL/LABP

**\*\*\*ÚLTIMA FOLHA DO PADRÃO\*\*\***