



## **CALDO LACTOSADO VERDE BRILHANTE (VRBL)**

### **CONFIRMAÇÃO DE COLIFORMES**

#### **USO**

O Caldo Lactosado Verde Brilhante (VRBL) é usado para a confirmação de Coliformes e Coliformes termotolerante em alimentos e água.

A fórmula padrão do caldo atende à composição definida nas normas de microbiologia de alimentos NF ISO 4831 e NF ISO 4832.

Ele também atende aos padrões usados para controle de água NF T90-413 e PR NF T90-413.

#### **HISTÓRIA**

A pesquisa e o desenvolvimento de um meio de cultura que inibe microrganismos diferentes dos coliformes há muito tempo é de interesse dos bacteriologistas. Já em 1926, Dunham e Schoenlein estudaram as proporções de bile e do verde brilhante com probabilidade de dar bons resultados. Em seu trabalho, Jordan demonstrou a superioridade desse meio em relação ao caldo de lactose para a detecção de coliformes em água.

Para o controle da pasteurização do leite, MacCrady e Langevin usaram com sucesso bile e Caldo Lactosado Verde Brilhante para a detecção de Coliformes. Mackenzie verificou que o teor de verde brilhante é suficiente para inibir efetivamente a cultura de anaeróbios fermentadores de lactose, em particular *Clostridium perfringens*.

#### **PRINCÍPIOS**

A presença simultânea de bile e verde brilhante causa a inibição parcial dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, exceto Coliformes.

O teor de verde brilhante é determinado para prevenir o crescimento de anaeróbios fermentando de lactose a 44°C, evitando assim resultados falsos positivos.

O desenvolvimento de coliformes é manifestado pelo desenvolvimento de turbidez associada à produção de gás no tubo de Durham como resultado da fermentação da lactose.

#### **COMPOSIÇÃO TÍPICA**

(A composição pode ser ajustada para obter um desempenho ideal).

Para 1 litro de meio:

- Triptona ..... 10,0 g
- Bile bovina bacteriológica ..... 20,0 g
- Lactose ..... 10,0 g
- Verde brilhante ..... 13,3 mg

pH do meio pronto a usar a 25°C: 7,2 ± 0,2.

#### **PREPARAÇÃO**

- Suspender 40,0 g de meio desidratado (BK002) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada.
- Mexer lentamente até dissolver completamente.



- Distribuir em tubos contendo um tubo Durham.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Após o resfriamento, os tubos de Durham não devem conter bolhas.

- Reconstituição: 40,0 g/L
- Esterilização: 15 min a 121 °C

**NOTA:**

- O caldo de concentração dupla pode ser usado para aplicações específicas.
- Suspender 80,0 g de meio desidratado (BK002) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada.

## **INSTRUÇÃO DE USO**

### **Confirmação de Coliformes (padrão ISO 4831):**

- Transferir uma alçada de caldos simples e duplos de LST em tubos de VRBL preparado ou pronto para usar (BM011).
- Incubar por 24 ± 2 horas a 30 ± 1°C ou a 37 ± 1°C.
- Se a produção de gás não for observada nesta fase, incubar por 48 ± 2 horas.

- Semeando: Uma alçada
- Incubação: 24 a 48 h a 30 ou 37°C

### **Confirmação de Coliformes (padrão ISO 4832):**

- Escolha 5 colônias características em ágar VRBL e inocular nos tubos contendo Caldo Lactose Verde Brilhante preparado ou pronto para uso (BM011).
- Incubar por 24 ± 2 horas a 30 + 1°C ou a 37 ± 1°C.

- Semeando: Inocular 5 colônias
- Incubação: 24 h a 30 ou 37°C

### **Confirmação de Coliformes em água (padrão NF T90-413):**

- A partir de meios presuntivos (LST com concentração simples ou dupla), inocular uma alça de cultura para ser confirmada em tubos de VRBL preparado ou pronto para uso (BM011).
- Incubar por 48 horas a 37 ± 1°C para coliformes ou a 44 ± 1°C em um banho-maria para Coliformes termotolerantes.

- Semeando: Uma alçada
- Incubação: 48 h a 37 ou 44°C

## **LEITURA**

A fermentação da lactose resulta no aparecimento de gás nos tubos de Durham (volume pelo menos igual a 1/10 do volume do tubo) em menos de 48 horas. Indica a presença de coliformes.

## **CONTROLE DE QUALIDADE**

**Meio desidratado:** pó bege-verde a esverdeado e homogêneo.

**Meio preparado:** solução verde límpida.

Resultado do cultivo após 24-48 horas de incubação a 30°C (NF EN ISO 11133):

Microrganismos		Crescimento	Produção de gás (Sino de Durham)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	Bom	≥ 5 mm
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Bom	≥ 5 mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Parcialmente inibido	Negativo

Resultado do cultivo após 48 horas de incubação a 37°C (FD T 90-461):



Microrganismos		Crescimento	Produção de gás (Sino de Durham)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00179	Bom	≥ 5 mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00176	Parcialmente inibido	Negativo

### **ARMAZENAMENTO / VALIDADE DE PRATELEIRA**

**Meio desidratado:** 2-30°C.

**Meio preparado em tubos<sup>(\*)</sup>:** 90 dias a 2-25°C, protegido da luz.

(\*) Valor indicativo determinado em condições padrão de preparação, seguindo as instruções do fabricante.

### **APRESENTAÇÃO**

**Meio desidratado:**

Frasco de 500 g ..... BK002HA

**Meio pronto para usar (concentração simples) em tubos com tubos de Durham:**

Caixa de 50 tubos de 10 mL .....BM01108

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Dunham, H.G. and Schoenlein, H.W. 1926. Stain Technology, **1**: 129.

Jordan. 1927. Journal of American Water Works Association, **18**: 337.

McCrary and Langevin. 1932. Journal of Dairy Science, **15**: 321.

Mackenzie, E.F.W., Taylor, W.E., and Gilbert, W.E. 1948. Recent experiments in the rapid identification of *Bacterium coli* type I. Journal of General Microbiology, **2**: 197-204.

Rodier, J. 1984. L'analyse de l'eau. Dénombrement des coliformes, coliformes fécaux, et *Escherichia coli* présumés. Dunod 7ème Ed., 793-798.

NF T 90-413. Octobre 1985. Essais des eaux. Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

PR NF T 90-413. Mars 2012. Essais des eaux. Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

Journal Officiel du 21 Septembre 1968. Méthodes officielles de prélèvement et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées (Arrêté du 30 Août 1968).

NF ISO 4831. Octobre 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes. Technique du nombre le plus probable.

NF ISO 4832. Juillet 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes. Méthode par comptage des colonies.

### **OUTRAS INFORMAÇÕES**

As declarações feitas nas etiquetas têm precedência sobre as fórmulas ou instruções descritas neste documento e estão sujeitos a alterações a qualquer momento sem aviso prévio.



Código do documento: BLBVB\_FR\_v8.

Data de criação: 01-2003

Data de revisão: 07-2016

Motivo da revisão: Revisão geral