



Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Introdução à prática em microbiologia dos alimentos

Dra. Juliana Galvão
Samuel Ferreira Maciel

2024

Normas básicas no laboratório de microbiologia



Normas básicas no laboratório de microbiologia

Aulas práticas → objetivo de transmitir os princípios e métodos empregados na análise microbiológica de alimentos.

Diversos microrganismos (patógenos) → essencial seguir as normas de segurança, para evitar acidentes e contaminação.



Normas básicas no laboratório de microbiologia

ACIDENTES em laboratórios ocorrem devido **falta de atenção**, **atitudes incorretas** e até mesmo **pressa** em terminar os experimentos.



Perigos: agentes biológicos, temperaturas extremas, reagentes químicos, radiação ultravioleta, utensílios perfurocortantes etc.

Normas básicas no laboratório de microbiologia

Assumir postura cuidadosa e responsável durante os experimentos

Veja o "roteiro com normas de segurança no laboratório"

Normas básicas no laboratório de microbiologia

Trabalhar sempre perto da chama (bico de Bunsen)



Normas básicas no laboratório de microbiologia

Trabalhar sempre perto da chama (bico de Bunsen)



- 1 - regulador de ar fechado (chama menos aquecida, de cor amarelo-laranja);
- 2 - regulador de ar quase fechado;
- 3 - regulador de ar semiaberto (chama roxa tendendo para o azul);
- 4 - regulador de ar totalmente aberto (chama mais quente).

Normas básicas no laboratório de microbiologia

Utilização do bico de Bunsen

- ✓ Primeiramente, ligar a alimentação do gás;
- ✓ Verificar se as entradas de ar no cilindro do bico de Bunsen estão fechadas, pois é mais fácil acender a chama com a entrada de ar fechada;
- ✓ Abrir a válvula do ajuste da chama e aproximar uma fonte de chama (fósforo ou isqueiro) até a boca do bico de Bunsen;
- ✓ Após a chama acesa (amarelo-laranja), ajustar a entrada do ar até que chama fique azul;
- ✓ Para desligar o bico de Bunsen, é importante desligar primeiro a alimentação do gás e, depois que a chama se extinguir, desligar a válvula do bico. Esse procedimento garante que não fique gás retido na tubulação.

Normas básicas no laboratório de microbiologia

Capela de fluxo laminar

Equipamento projetado para criar áreas de trabalho estéreis para a manipulação de materiais biológicos e/ou estéreis, garantindo a segurança da manipulação.



Fluxo de ar unidirecional horizontal

Protege apenas o produto

Usuário exposto aos aerossóis provenientes do trabalho



Fluxo de ar unidirecional vertical

Protege produto e usuário

Usadas em trabalhos com patógenos

Normas básicas no laboratório de microbiologia

Esterilização - métodos empregados no laboratório de microbiologia

Calor seco x calor úmido

Calor seco: transferência mais lenta de calor que causa desidratação e desaceleração do metabolismo das células (oxidação dos constituintes orgânicos). Ex. estufa ou forno a 170 °C por 1-2 h.

Calor úmido: provoca desnaturação irreversível de proteínas através da alta temperatura e umidade. Ex. autoclave a 121 °C por 15 min



Meios de cultura



Meios de cultura

O que são?

Formulação química que contém uma combinação qualitativa e quantitativa de nutrientes, permitindo o cultivo de microrganismos fora do meio natural.

Composição

- Fonte de nitrogênio - proteínas, peptídeos, aminoácidos
- Fonte de carbono - carboidratos, principal fonte de energia
- Minerais essenciais (g/L) - Mg, Fe, Na, Cl, S, K, P
- Elementos traço (mg - $\mu\text{g/L}$) - vitaminas Zn, Mn, Br, Cu, Co
- Agentes tamponantes - fosfatos, acetatos, citratos
- Indicadores de pH - vermelho de fenol etc.
- Agente solidificante - ágar (carboidrato complexo obtido a partir de algas marinhas, insolúvel em água à temperatura ambiente)

Classificação quanto à consistência

Líquido
(caldo)



turvação do
meio

Semi-sólido
(0,4 a 0,6% ágar)



turvação do meio
motilidade (movimento) da bactéria

Sólido
(1,3 a 1,5% ágar)



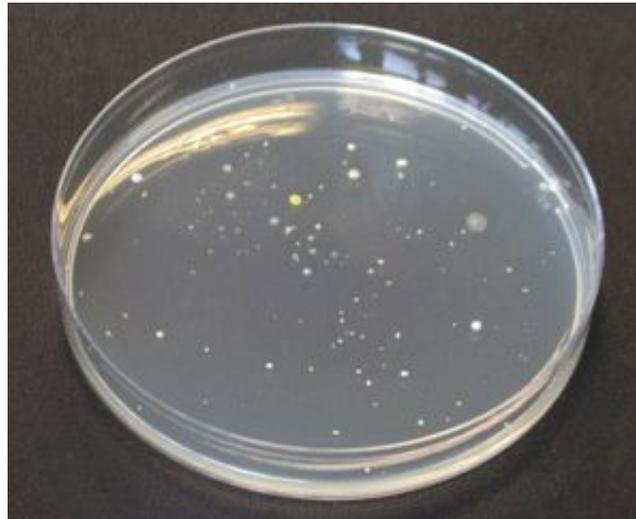
formação de
colônias

Classificação quanto ao tipo

Meios não seletivos

Permitem o desenvolvimento de grande variedade de microrganismos.

Exemplo: Plate Count Agar (PCA)



Triptona	5,0 g
Extrato de Levedura	2,5 g
Glicose	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Classificação quanto ao tipo

Meios seletivos

Compostos inibem microrganismos indesejáveis sem inibir os desejáveis (adição de antibióticos e outras substâncias com capacidade inibitória).

Exemplo: Potato Dextrose Agar (PDA) + ácido tartárico 10%
Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)



Classificação quanto ao tipo

Meios seletivos diferenciais

Permitem a diferenciação de microrganismos com base em reações bioquímicas.

Exemplo: Ágar MacConkey

Utilizado para isolamento de bactérias gram-negativas e indica a fermentação de lactose.

Lac+: capazes de fermentar a lactose - colônias rosas

Ex. *Escherichia coli* e *Klebsiella*

Lac-: incapazes de fermentar a lactose - colônias incolores

Ex. *Salmonella* e *Pseudomonas*



Classificação quanto ao tipo

Meios de enriquecimento

Permite o aumento da concentração dos microrganismos presentes na amostra (preparações líquidas).

Exemplos: Brain Heart Infusion Broth (BHI) para o cultivo de micro-organismos injuriados e não injuriados em amostras diversas.

Lactose Broth ou Buffered Peptone Water (BPW) para análise de *Salmonella* spp.



Classificação quanto ao tipo

Meios de enriquecimento seletivo

Inibe o desenvolvimento de alguns microrganismos, propiciando o desenvolvimento de outros.

Exemplo: Rappaport-Vassiliadis Broth (RV) e Tetrathionate Broth (TT) para análise de *Salmonella* spp.



Classificação quanto ao tipo

Meios indicadores

Possibilita a análise das propriedades bioquímicas dos microrganismos, facilitando sua identificação.

Exemplo: Triple Sugar Iron Agar (TSI) e Lysine Iron Agar (LIA) para identificação de *Salmonella* spp.



Classificação quanto ao tipo

Meios de conservação e manutenção

Não favorece a multiplicação e conserva os microrganismos.

Ex.: Nutrient Agar

Utilizado para a conservação e manutenção de culturas em temperatura ambiente e como método opcional para os laboratórios que não dispõem do método da criopreservação (congelamento das cepas em freezer à -70°C).



Constituent	Amount
Peptone (partially digested protein)	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Sodium chloride	8.0 g
Agar	15.0 g
Water	1 liter

Procedimientos para análise microbiológica de alimentos



Procedimentos para análise microbiológica de alimentos

Preparo dos meios de cultura

- De acordo com instruções do fabricante.

Preparo do local de trabalho

- Higienizar a bancada (álcool 70%)
- Verificar se todo material está disponível: pissetas de álcool, recipiente para descarte, alças, meios de cultura fundidos, placas, tubos etc.



Preparação da amostra para análise

- ✓ Registrar dados sobre a amostra (produto, local e data de coleta/recebimento e análise);
- ✓ Observar as condições da embalagem;
- ✓ Desinfetar embalagem com álcool;
- ✓ Homogeneizar o produto;
- ✓ Abrir assepticamente a embalagem (fluxo laminar ou bico de Bunsen, além de utensílios estéreis);

Preparação da amostra para análise

- ✓ Retirar a unidade analítica (10, 25 ou 50 g ou mL)

Amostras líquidas (viscosidade \leq leite) - retirar a unidade analítica com uma pipeta;

Amostras sólidas ou líquidos concentrados - se for heterogênea (ex. bolos recheados), compor a unidade analítica com porções das diferentes camadas;

Carcças de animais, embalagens - técnica do esfregaço de superfície ("swabs" ou esponjas estéreis);

Carcças pequenas, grãos, sementes e similares - técnica da lavagem superficial.

Preparação da amostra para análise

- ✓ Preparo da diluição (1:10) - ex. 25 g para 225 mL diluente

solução peptona 0,1%

solução salina 0,85%

tampão fosfato pH 7,2

solução salina peptonada

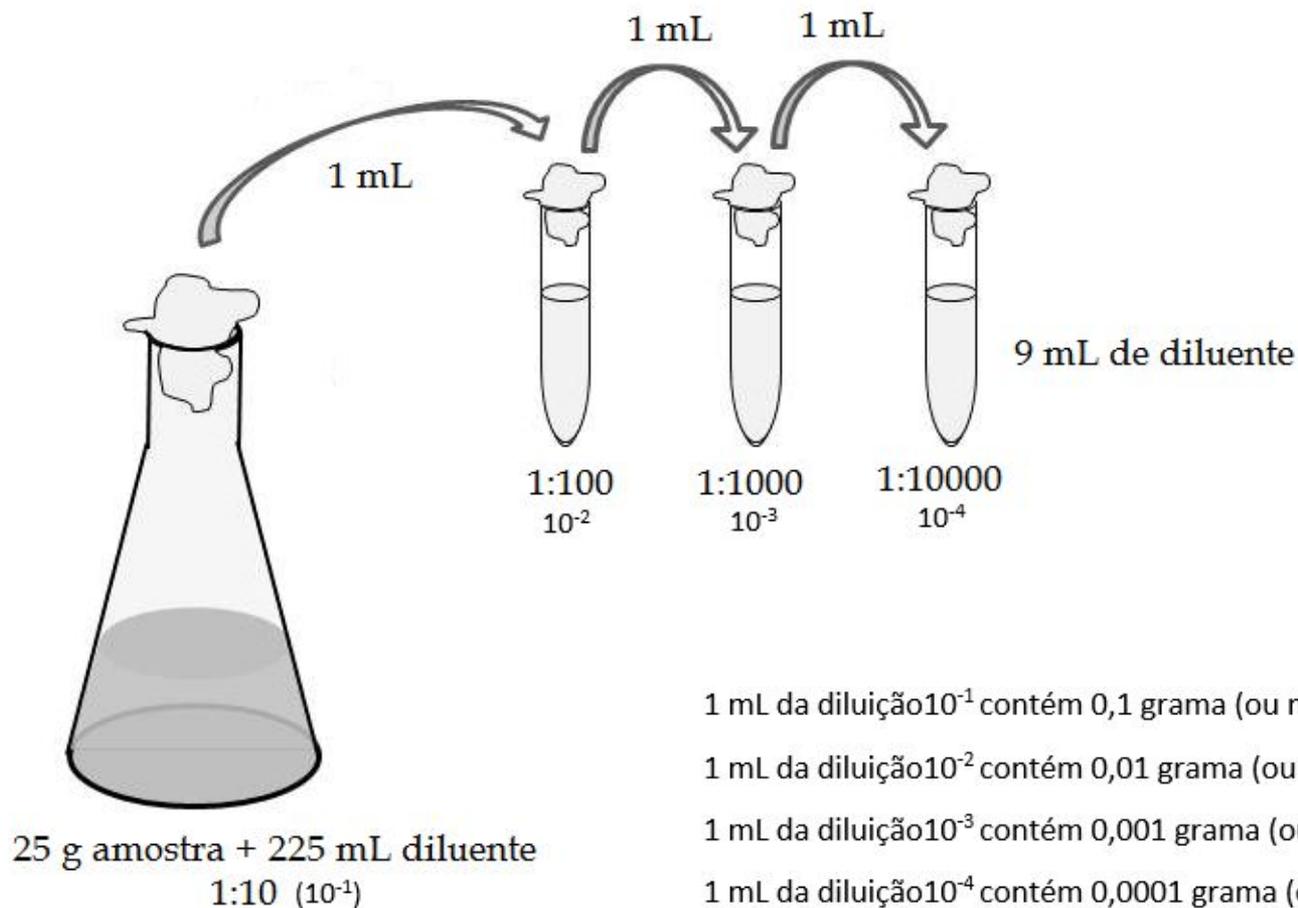


- ✓ Homogeneização

Liquidificador ou "stomacher" (30-60 segundos)

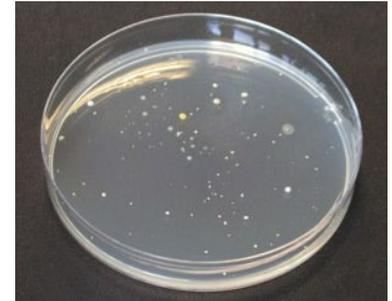
Preparação da amostra para análise

- ✓ Diluição decimal seriada da amostra



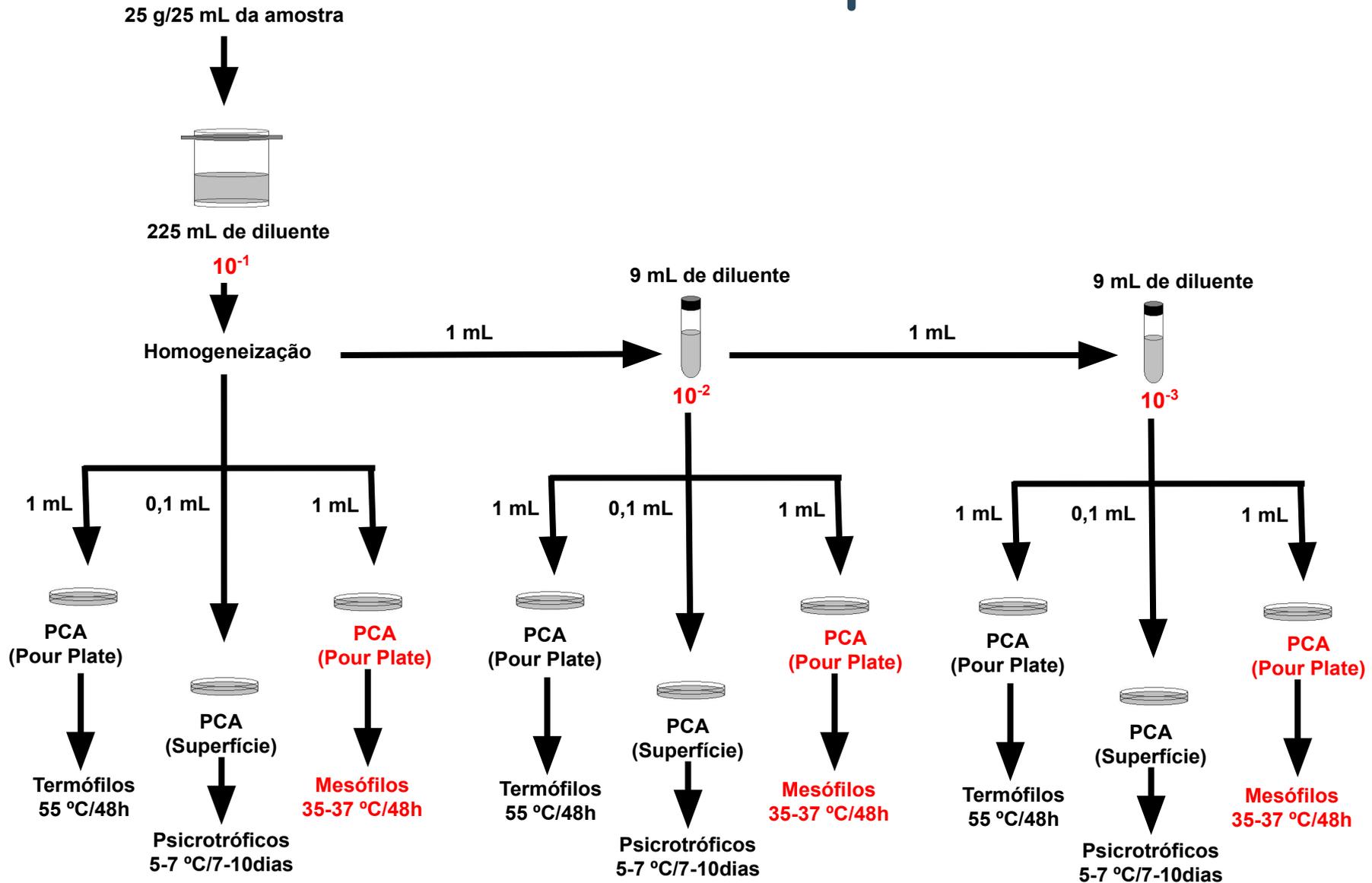
Semeadura x enumeração

Contagem em placas



- ✓ Mede o número de células viáveis;
- ✓ São necessárias ao menos 24 h para que colônias visíveis sejam formadas;
- ✓ As contagens em placas consideram que cada bactéria viva cresce e se divide para produzir uma única colônia - denominadas unidades formadoras de colônias (UFC);
- ✓ Importante ter um número limitado de colônias na placa (25 - 250 colônias).

Semeadura em placas



Resultados

Contagem das colônias e cálculo dos resultados

- Seleccionar as placas com 25 a 250 colônias para contagem;
- O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro da amostra será o número de colônias contadas multiplicado pelo inverso da diluição inoculada;
 - O inverso da diluição 10^{-1} é 10^1 , o inverso da 10^{-2} é 10^2 e assim por diante...
 - Duas placas por diluição (duplicata) □ média aritmética da contagem obtida em cada uma das placas da duplicata;

Resultado final

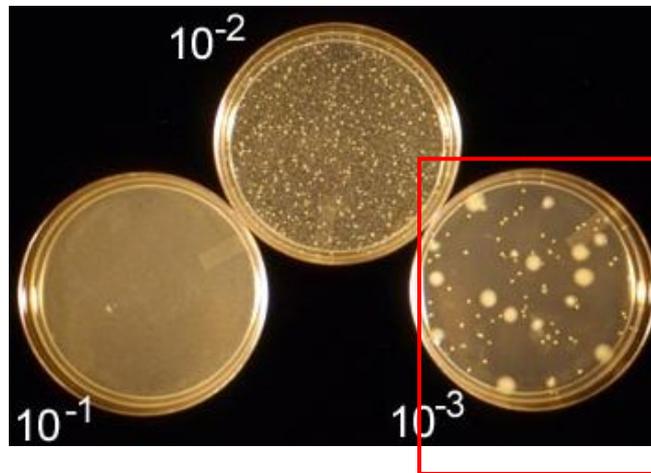
- Usar notação exponencial
- Usar uma casa decimal depois da vírgula

Resultados

Contagem das colônias e cálculo dos resultados

Ex: Contagem total de aeróbios mesófilos

Semeadura em profundidade (1 mL)



Diluição 10^{-3}

85 colônias

65 colônias (duplicata)

Resultado: $75 \times 10^3 = 7,5 \times 10^4$ UFC/g

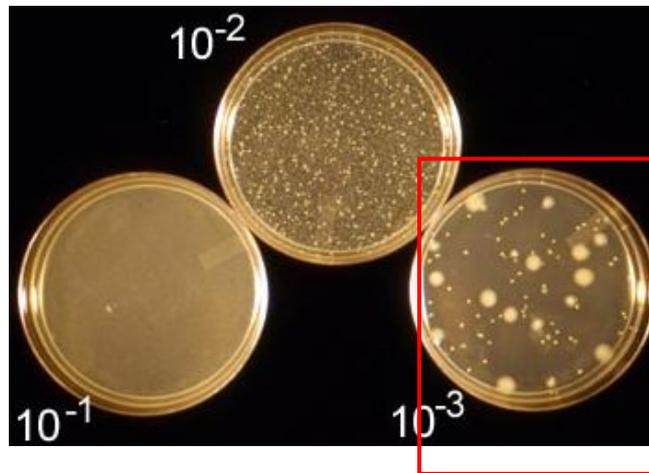
$$\frac{85 \times 10^3 + 65 \times 10^3}{2} =$$

Resultados

Contagem das colônias e cálculo dos resultados

Ex: Contagem total de aeróbios mesófilos

Semeadura em superfície (0,1 mL)



Diluição 10^{-3}

85 colônias

65 colônias (duplicata)

Resultado: $75 \times 10 \times 10^3$ $7,5 \times 10^5$ UFC/g

$$\frac{85 \times 10^3}{2} + \frac{65 \times 10^3}{2} =$$

Semeadura x enumeração

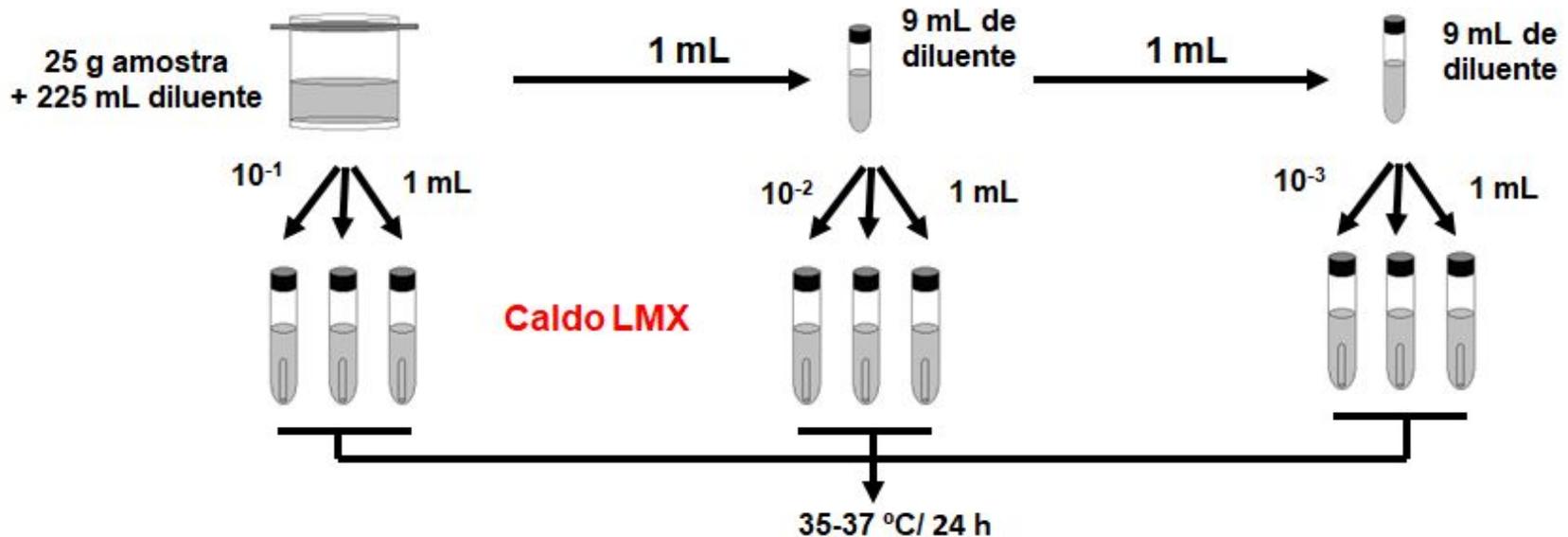
Método do Número Mais Provável (NMP) - tubos múltiplos

- ✓ Método que permite estimar a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra.
- ✓ Esta técnica não permite a contagem "fixa" de células viáveis ou de unidades formadoras de colônias (UFC), como acontece com a técnica de contagem em placas.

Recomendada quando: é esperado um baixo número do micro-organismo alvo (<100/g ou mL) ou quando, devido ao processo tecnológico sofrido pelo alimento, as células presentes estejam lesadas fisiologicamente (células estressadas), não tendo portanto condições de formar colônias em meios sólidos seletivos.

Semeadura em tubos

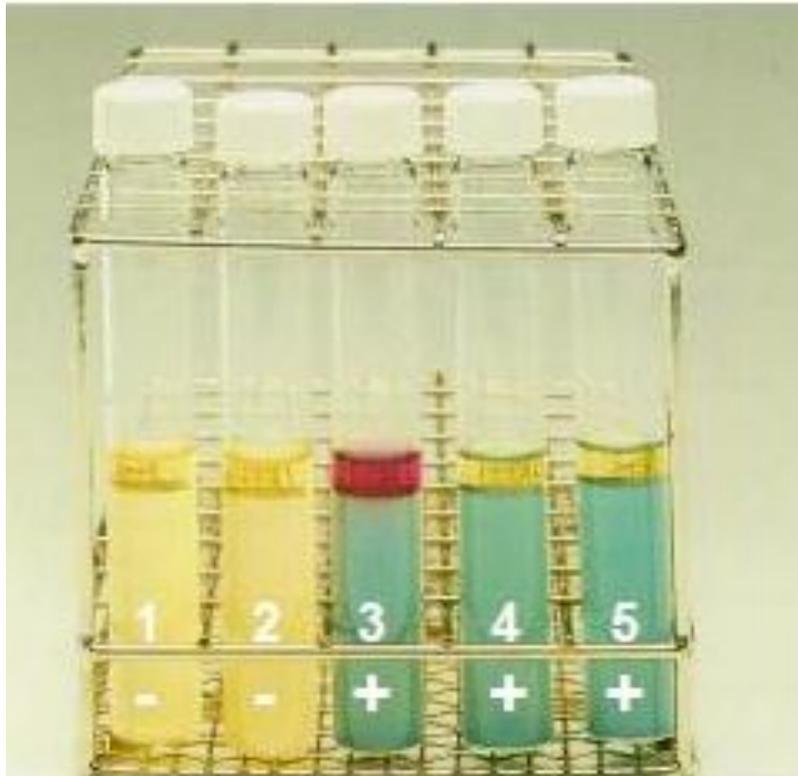
- Expressão de resultados: consultar tabelas de NMP



Coliformes totais: mudança da cor do caldo de amarelo para azul-verde.

Escherichia coli: fluorescência azul sob luz UV.

Resultados



Resultados

Exemplo: Determinar o NMP de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC) em amostra de suco natural.

- Série de três diluições, com três tubos por diluição
- Quantidade de amostra nas alíquotas = 1 mL

Meio de cultura (Caldo LMX)	Diluições		
	-1	-2	-3
CT	3+	2+	1+
EC	2+	1+	0

Resultados

Tabelas de NMP

Tabela NMP-1. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 0,1 - 0,01 e 0,001g ou ml.

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	180
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Coliformes totais

E. coli

Outras técnicas

Outros métodos para medida direta do crescimento microbiano

Filtração

Método empregado quando a quantidade de bactérias é muito pequena (ex. corrente de água).

Contagem microscópica direta

Consiste em fazer um esfregaço com a amostra de alimento ou cultura microbiana sob uma lâmina de microscópio, corar com um corante apropriado, visualizar e contar as células com auxílio do microscópio (= rapidez, simplicidade).

Outras técnicas

Outros métodos para medida indireta do crescimento microbiano

Turbidimetria

À medida em que as bactérias se multiplicam em um meio líquido, o meio se torna turvo ou opaco com as células - *espectrofotômetro*.

Atividade metabólica

Assume que a quantidade de um produto metabólico determinado, como um ácido, é diretamente proporcional ao número de bactérias presentes.

Técnicas básicas de detecção (presença/ausência)

