

AULA PRÁTICA 1 – MICRORGANISMOS INDICADORES NOS ALIMENTOS

1 ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS

1.1 MATERIAL

- ✓ Saco para homogeneização de amostras
- ✓ Frasco com 225 mL de diluente estéril (água peptonada 0,1%)
- ✓ Tubos de ensaio com 9 mL de água peptonada 0,1%
- ✓ Meio de cultura: Ágar Padrão para Contagem (PCA)
- ✓ Pipetas estéreis
- ✓ Placas de Petri estéreis
- ✓ *Stomacher* (homogeneizador de amostras)
- ✓ Agitador de tubos
- ✓ Estufa regulada a 35-37 °C
- ✓ Banho maria regulado a 45-50 °C
- ✓ Contador de colônias

1.2 PROCEDIMENTO

- ✓ Pesar assepticamente 25 g do alimento no saco para homogeneização de amostras;
 - ✓ Adicionar 225 mL de água peptonada 0,1%;
 - ✓ Homogeneizar por ~1 minuto em *Stomacher* (essa é a diluição 10^{-1});
- Obs: para alimentos líquidos, pode-se preparar a diluição 10^{-1} transferindo 1 mL da amostra (ex. leite) para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%.
- ✓ A partir da diluição inicial (10^{-1}), realizar diluições subsequentes. Para isso, transferir 1 mL da diluição anterior para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (= 10^{-2}) e assim por diante, até a diluição desejada. Utilizar agitador de tubos para homogeneização;
 - ✓ Semear 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis;
 - ✓ Adicionar de 15 a 20 mL do meio de cultura (PCA) fundido e resfriado a 45 °C;
 - ✓ Homogeneizar adequadamente o meio com o inóculo (agitação lenta no plano horizontal em movimento de "8");
 - ✓ Deixar solidificar em superfície plana, inverter as placas e incubá-las em estufa regulada a 35-37 °C por 48 horas.

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

LCA0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

1.3 RESULTADO

Realizar a leitura selecionando placas que contenham entre 25 e 250 colônias. Contar todas as colônias presentes. Expressar o resultado em “Unidades Formadoras de Colônias” por grama ou mL do alimento (UFC/g ou UFC/mL).

Quadro para apresentação dos resultados

Diluição	Duplicata		Média
	N° de colônias	N° de colônias	
10 ⁻¹			
10 ⁻²			
10 ⁻³			
10 ⁻⁴			
10 ⁻⁵			
Resultado:			

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

LCA0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

2 ENUMERAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS

2.1 MATERIAL

- ✓ Saco para homogeneização de amostras
- ✓ Frasco com 225 mL de diluente estéril (água peptonada 0,1%)
- ✓ Tubos de ensaio com 9 mL de água peptonada 0,1%
- ✓ Placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Batata Dextrose (PDA) acidificado. O meio preparado e resfriado é acidificado (pH 3,5) por meio da adição de solução de ácido tartárico 10%.
- ✓ Pipetas estéreis
- ✓ Alças de Drigalski estéreis
- ✓ Agitador de tubos
- ✓ *Stomacher* (homogeneizador de amostras)
- ✓ Incubadora BOD regulada a 25 °C
- ✓ Contador de colônias

2.2 PROCEDIMENTO

- ✓ Pesar assepticamente 25 g do alimento no saco para homogeneização de amostras;
 - ✓ Adicionar 225 mL de água peptonada 0,1%;
 - ✓ Homogeneizar por ~1 minuto em *Stomacher* (essa é a diluição 10^{-1});
- Obs: para alimentos líquidos, pode-se preparar a diluição 10^{-1} transferindo 1 mL da amostra (ex. leite) para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%.
- ✓ A partir da diluição inicial (10^{-1}), realizar diluições subsequentes. Para isso, transferir 1 mL da diluição anterior para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (= 10^{-2}) e assim por diante, até a diluição desejada. Utilizar agitador de tubos para homogeneização;
 - ✓ Utilizar a técnica de semeadura em superfície, transferindo 0,1 mL de cada diluição selecionada para Placas de Petri contendo o meio PDA acidificado (superfície seca);
 - ✓ Com o auxílio de alça de Drigalski, espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção;
 - ✓ Incubar as placas, sem inverter, em incubadora BOD regulada a 25 °C por 3 a 5 dias.

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

LCA0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

2.3 RESULTADO

Realizar a leitura selecionando placas que contenham entre 15 e 150 colônias. Contar todas as colônias presentes. Expressar o resultado em “Unidades Formadoras de Colônias” por grama ou mL do alimento (UFC/g ou UFC/mL).

OBS: Não abrir, em hipótese alguma, as placas que contenham crescimento de fungos, para evitar a contaminação ambiental por meio da dispersão dos seus esporos.

Quadro para apresentação dos resultados

Diluição	Duplicata		Média
	Nº de colônias	Nº de colônias	
10 ⁻¹			
10 ⁻²			
10 ⁻³			
10 ⁻⁴			
10 ⁻⁵			
Resultado:			

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

LCA0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

3 ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI* PELA TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL

3.1 MATERIAL

- ✓ Saco para homogeneização de amostras
- ✓ Frasco com 225 mL de diluente estéril (água peptonada 0,1%)
- ✓ Tubos de ensaio com 9 mL de água peptonada 0,1%
- ✓ Tubos contendo caldo Fluorocult LMX
- ✓ Pipetas estéreis
- ✓ *Stomacher* (homogeneizador de amostras) e agitador de tubos
- ✓ Estufa regulada a 35-37 °C.

3.2 PROCEDIMENTO

- ✓ Pesar assepticamente 25 g do alimento no saco para homogeneização de amostras;
 - ✓ Adicionar 225 mL de água peptonada 0,1%;
 - ✓ Homogeneizar por ~1 minuto em *Stomacher* (essa é a diluição 10^{-1});
- Obs: para alimentos líquidos, pode-se preparar a diluição 10^{-1} transferindo 1 mL da amostra (ex. leite) para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%.
- ✓ A partir da diluição inicial (10^{-1}), realizar diluições subsequentes. Para isso, transferir 1 mL da diluição anterior para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (= 10^{-2}) e assim por diante, até a diluição desejada (obs. faremos até a diluição 10^{-3}). Utilizar agitador de tubos para homogeneização.
 - ✓ De cada diluição do alimento, transferir 1 mL para série de três tubos contendo 10 mL do caldo Fluorocult LMX. Homogeneizar através de agitação cuidadosa.
 - ✓ Incubar os tubos inoculados a 35-37 °C por 24 horas.

3.3 RESULTADO

Observar os tubos: a mudança da cor do caldo de amarelo para azul-esverdeado indica a presença de coliformes, enquanto uma fluorescência azul sob luz UV indica a presença de *Escherichia coli*.

Calcular o "Número Mais Provável" (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli* por grama ou mL de alimento, utilizando a tabela a seguir:

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

LCA0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

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	110
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	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2020).

OBS: A técnica do NMP é uma forma de se estimar o número de microrganismos presentes na amostra. É baseada na probabilidade estatística de certo número de microrganismos estarem presentes na amostra quando uma série de resultados positivos ocorrem. Portanto, este é um método indireto de contagem, em contraste com a técnica de semeadura em placa, que pode ser considerada como um método direto de contagem.

Quadro para apresentação dos resultados

Diluição	N° tubos positivos	
	Coliformes totais	<i>Escherichia coli</i>
10 ⁻¹		
10 ⁻²		
10 ⁻³		
Resultado (coliformes totais):		
Resultado (<i>Escherichia coli</i>):		