

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

Responsável: Profa. Dra. Daniele Fernanda Maffei

AULA PRÁTICA 3 – MICRORGANISMOS INDICADORES NA ÁGUA

1 ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

1.1 MATERIAL

- ✓ Frasco para amostra (100 mL)
- ✓ 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
- ✓ Agitador de tubos
- ✓ Estufa regulada a 35-37 °C
- ✓ Banho maria regulado a 45-50 °C
- ✓ Contador de colônias

1.2 PROCEDIMENTO

- ✓ A partir da amostra de água pura, realizar diluições sucessivas em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. Utilizar agitador de tubos para homogeneização;

Diluições: transferir 1 mL da água pura (10^0) para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% ($=10^{-1}$). A partir desta, fazer as diluições subsequentes, até a diluição desejada (nesta aula faremos até a diluição 10^{-3}).

- ✓ Semear 1 mL de cada diluição (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) 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 24-48 horas.

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 (UFC/mL).

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

Responsável: Profa. Dra. Daniele Fernanda Maffei

Quadro para apresentação dos resultados

Diluição	Duplicata		Média
	Nº de colônias	Nº de colônias	
10 ⁰			
10 ⁻¹			
10 ⁻²			
10 ⁻³			
Resultado:			

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

Responsável: Profa. Dra. Daniele Fernanda Maffei

2 PESQUISA E ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI* EM ÁGUA

Método oficial da AOAC International, descrito do Capítulo 17 da 20ª edição do *Official Methods of AOAC International* (Latimer, 2016).

2.1 MATERIAL

- ✓ Frasco estéril para amostra de água (100 mL)
- ✓ Substrato cromogênico Colilert® ou equivalente
- ✓ Tubos de ensaio vazios estéreis
- ✓ Pipetas estéreis (10 mL)
- ✓ Estufa regulada a 35-37 °C

2.2 PROCEDIMENTO

2.2.1 Teste de presença/ausência em 100 mL

- ✓ Obter 100 mL da amostra em um frasco estéril. Para amostras de água clorada (sem prévia neutralização do cloro), utilizar frascos estéreis contendo pastilhas de tiosulfato de sódio;
- ✓ Abrir a ampola contendo a quantidade pré-distribuída do substrato de cultura, disponível comercialmente já esterilizado;
- ✓ Assepticamente, adicionar o substrato aos 100 mL de amostra de água e homogeneizar;
- ✓ Incubar o frasco em estufa regulada a 35-37 °C por 24 horas.

2.2.2 Enumeração pela técnica dos tubos múltiplos (NMP)

- ✓ O procedimento inicial é semelhante ao teste de presença/ausência: adicionar o substrato de cultura no frasco contendo a amostra e homogeneizar;
- ✓ Dividir o volume total (100 mL) em 10 alíquotas de 10 mL, transferidos para 10 tubos de ensaio estéreis vazios;
- ✓ Incubar os tubos em estufa regulada a 35-37 °C por 24 horas.

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

Responsável: Profa. Dra. Daniele Fernanda Maffei

2.3 RESULTADO

- ✓ Observar o desenvolvimento de cor amarela, confirmativa da presença de coliformes totais. Observar também, sob lâmpada de luz ultravioleta (365 a 366 nm), a ocorrência de fluorescência azulada, confirmativa da presença de *E. coli*.
- ✓ Para o teste de presença/ausência, expressar o resultado como presença ou ausência de coliformes totais e *E. coli* em 100 mL.
- ✓ Para o ensaio de enumeração, anotar o número de tubos positivos para determinar o Número Mais Provável de coliformes totais e *E. coli* em 100 mL, utilizando a tabela a seguir:

Tabela NMP-3. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 10 alíquotas de 10g ou ml da amostra por tubo.

Número de tubos positivos	NMP/100 ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo
0	<1,1	-	3,3
1	1,1	0,05	5,9
2	2,2	0,37	8,1
3	3,6	0,91	9,7
4	5,1	1,6	13
5	6,9	2,5	15
6	9,2	3,3	19
7	12	4,8	24
8	16	5,9	33
9	23	8,1	53
10	>23	12	-

Fonte: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd edition (Braun-Howland & Hunt, 2017).