

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRADE SANTANA

ENGENHARIA DE ALIMENTOS BACHARELADO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Manual da Disciplina

MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

Professora:
Elinalva Maciel Paulo

Carga Horária:
Teórica 30 h
Prática 30 h

Feira de Santana – Bahia
2005.1

2. PLANO DE DISCIPLINA

2.1 EMENTA

Introdução à microbiologia dos alimentos. Crescimento bacteriano. Técnicas microbiológicas aplicadas à microbiologia dos alimentos. Ecologia microbiana dos alimentos. Contaminação e deterioração dos alimentos. Toxinfecções alimentares. Conservação dos alimentos. Controle microbiológico de alimentos. Padrões microbiológicos e APPCC.

2.2.1. Objetivo Geral

Ao final do curso os alunos deverão conhecer os fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano dos alimentos, os principais microrganismos deteriorantes dos alimentos e a sua influência na saúde do consumidor, bem como os métodos de análises.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Fornecer aos alunos conhecimentos sobre os tipos de microrganismos de interesse em alimentos;
- Mostrar os diferentes fatores que contribuem para a colonização dos microrganismos nos alimentos,
- Conhecer os principais microrganismos deteriorantes e patogênicos encontrados nos alimentos,
- Ressaltar a importância da escolha do método do controle do crescimento microbiano no alimento.

2.3. CONTEÚDO PROGRAMÁTICO

PROGRAMA TEÓRICO

I UNIDADE

- 01- Importância dos microrganismos nos alimentos
- 02- Fatores extrínsecos que controlam o crescimento bacteriano
- 03- Fatores intrínsecos que controlam o crescimento bacteriano
- 04- Bactérias patogênicas transmitidos pelos alimentos: Enterobactérias (*Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia*), *Vibrios*, *Yersinia*, *Campylobacter*
- 05- Bactérias patogênicas transmitidas pelos alimentos: *Listéria*, *Staphylococcus aureus*, *Clostrídios*, *Bacillus*
- 06- Protozoários transmitidos pelos alimentos:
- 07- helmintos – transmitidos pelos alimentos ,
- 08-vírus transmitidos pelos alimentos,
- 09- Micotoxinas

II UNIDADE

- 01- Microrganismo indicador- Amostragem, padrões microbiológicos
02. Deterioração de carne, frango, ovos e pescados
- 03- Deterioração microbiana de cereais, farinhas, produtos lácteos e doces
- 04- Conservação dos alimentos – métodos físicos
- 05- Conservação dos Alimentos – métodos químicos e biológicos
- 06- Conservação dos Alimentos – métodos químicos e biológicos
- 07- GMP, PPHO, HACCP

PROGRAMA PRÁTICO

I UNIDADE

- 01- Montagem de materiais para esterilização / Preparo de Meios de cultura
- 02- Reações tintoriais: coloração de Gram,
- 03- Reações tintoriais: coloração de esporos: Wirtz Conklin
- 04- Técnicas de semeadura
- 05- Preparo de amostras de alimentos para análises: diluição e plaqueamento
- 06- Contagem de Bactérias mesófilas, psicrófilas e termófilas,
- 07- Esterilidade comercial
- 08- Contagem de bolor e levedura, Esterilidade comercial

II UNIDADE

- 01- Avaliação da qualidade do leite - (teste da fervura, teste do álcool teste do azul de metileno)
- 02-Contagem de coliformes a 37° C e a 45° C
- 03- Contagem de Staphylococcus coagulase positiva
- 04- Contagem de Bacillus cereus
- 05- Contagem de Clostrídios sulfito redutor
- 06- Detecção de Salmonella
- 07- Detecção de vibrios
- 08- Microrganismos presentes em produtos comerciais

2.4. MÉTODO

Aulas expositivas induzindo os alunos a discussão, pesquisas em artigos científicos, realização de seminários e realização de práticas relacionadas com os assuntos teóricos.

2.5. RECURSOS DIDÁTICOS

Para as aulas expositivas: quadro, transparências e multimídia.

Para as aulas práticas: vidrarias, meios de cultura, corantes , reagentes e microrganismos teste.

2.6. AVALIAÇÃO

Provas escritas com questões objetivas e subjetivas acerca do conteúdo teórico

Relatórios das aulas práticas

Seminário

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÁSICA

FRANCO, B. G. M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, ed. Atheneu, 1999

JAMES, M. J. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza(Espana): Acribia, 4º ed. 1994

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de Alimentos**, EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (Rio de Janeiro). Brasília: EMBRAPA. SPI, Rio de Janeiro EMBRAPA_CTTA, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. ;SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo, Varela, 1997

COMPLEMENTAR

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods** 3º ed. New York: Vanderzant, 1992.

FRAZIER, W. C.WESTHOF, D. C. **Food Microbiology**, 4o ed McGraw-Holl, p. 17-58, 1988.

BOURGEOIS, C. M E LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: acribia, 1995.

ICMSF. **Métodos de muestra para analisis microbiológicas: principio e aplicaciones específicas**. Zaragoza: Acribia, 1995

3. PLANO DE AULA

N.AULA/DIA	CONTEÚDO	RECURSOS UTILIZADOS	METODOLOGIA
01/02 11/10	T – Microrganismos de interesse em alimentos: prions, vírus, bactérias, fungos, protozoários e “helmintos”	Materiais: Quadro branco, piloto, retroprojeter.	Aula expositiva Aula Prática
11-15/10	P – Montagem de materiais para esterilização / Preparo de Meios de cultura	Materiais: materiais de laboratórios	
03/04 18/10	T- Fatores extrínsecos que controlam o crescimento bacteriano	Materiais: Quadro branco, piloto, retroprojeter.	Aula expositiva Aula Prática
18-22/10	P – Reações tintoriais: coloração de Gram,	Materiais: materiais de laboratórios	
05/06 25/10	T — Fatores intrínsecos que controlam o crescimento bacteriano	Materiais: Quadro branco, piloto, retroprojeter.	Aula expositiva Aula Prática
25-29/10	P – Reações tintoriais: coloração de esporos: Wirtz Conklin	Materiais: materiais de laboratórios	
07/08 01/11	T- Toxinfecção alimentar: Enterobactérias (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> e <i>Escherichia</i>), <i>Vibrios</i> , <i>Yersínia</i> , <i>Campylobacter</i>	Materiais: Quadro branco, piloto, retroprojeter, Data show.	Seminário Aula Prática
01-05/11	P- – Técnicas de semeadura	Materiais: materiais de laboratórios	
09/10 08/11 08-12/11	T - Toxinfecção alimentar: Listéria, Staphylococcus aureus, Clostrídios, Bacillus P – Prepara de amostras de alimentos para análises: diluição e plaqueamento	Materiais: Quadro branco, piloto, retroprojeter. Data show. Materiais: materiais de laboratórios.	Seminário Aula Prática
11/12 22/11	T- Protozoários transmitidos pelos alimentos: helmintos – transmitidos pelos alimentos , vírus transmitidos pelos alimentos, Micotoxinas P- Contagem de Bactérias mesófilas, psicrotófilas e termófilas,	Materiais: Quadro branco, piloto, retroprojeter. Data show. Materiais: materiais de laboratórios	Seminário Aula Prática
13/14 29/11	T – I AVALIAÇÃO ESCRITA P- Contagem de bolor e levedura, Esterilidade comercial	Materiais: Prova impressa Materiais: materiais de laboratórios	Aplicação da prova Aula Prática
15/16 06/12	T Microrganismo indicador- Amostragem, portaria RCD no 12-01/02/2001- (ANVISA)	Materiais: Quadro branco, piloto, retroprojeter. Materiais: materiais de laboratórios	Seminário Aula Prática

	P – Avaliação da qualidade do leite - (teste da fervura, teste do álcool teste do azul de metileno) - Esterilidade comercial		
17/18 13/12	T – Deterioração de carne, frango, ovos e pescados P – análise microbiológica de pratos prontos à base de pescados crus (sushi, sashimi, etc.): Coliformes a 45° , Estaf. Coag.positiva, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella</i>	Materiais: Quadro branco, piloto,retroprojektor. Materiais: materiais de laboratórios	Seminário Aula Prática
19/20 20/12	T Deterioração microbiana dos vegetais P- Análise microbiológica de hortaliças: Coliformes a 45° C, <i>Salmonella sp.</i> , contagem de mesófilos	Materiais: Quadro branco, piloto,retroprojektor. Materiais: materiais de laboratórios	Seminário Aula Prática
21/22 07/02/06	T –Deterioração microbiana de cereais, farinhas, produtos lácteos e doces P – Análise microbiológica da granola: <i>B. cereus</i> , coliformes a 45° C, estaf. Coagulase positiva, <i>Salmonella</i>	Materiais: prova impressa Materiais: materiais de laboratórios	Prova escrita Aula Prática
23/24 14/02/06	T Conservação dos alimentos – métodos físicos P – Análise microbiológica da lingüiça: Coliformes a 45° C, <i>Salmonella</i> , Clostrídio sulfito redutor	Materiais: Quadro branco, piloto,retroprojektor. Materiais: materiais de laboratórios	Aula expositiva Aula Prática
25/26 21/02/06	T – Conservação dos Alimentos – métodos químicos e biológicos P- Análise microbiológica do queijo de coalho: Coliformes a 45° C, <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Materiais: Quadro branco, piloto,retroprojektor. Materiais: materiais de laboratórios	Aula expositiva Aula Prática
27/28 08/03	T – GMP, PPHO, HACCP P – Microrganismos presentes em produtos comerciais	Materiais: Quadro branco, piloto,retroprojektor. Materiais: materiais de laboratórios	Aula expositiva Aula Prática
29/30 15/03	II AVALIAÇÃO ESCRITA	Materiais: Prova impressa Materiais: materiais de laboratórios	Aplicação da prova Aula Prática

4. INSTRUÇÕES GERAIS DA DISCIPLINA E DO LABORATÓRIO

1. Estudar previamente a aula prática a ser realizada;
2. Ser pontual no horário previsto para início das aulas;
3. Trabalhar com ATENÇÃO, CALMA e seguir sempre o roteiro de aula;
4. Solicitar aos professores esclarecimentos sobre todas as dúvidas;
5. Usar somente os materiais de sua própria bancada;
6. Cuidado para não contaminar reagentes e soluções;
7. Ter o máximo de cuidado para evitar acidentes consigo e com os colegas. Caso ocorra, avise imediatamente o professor. **O laboratório não é lugar para brincadeiras;**
8. É **obrigatório** o uso do jaleco (avental) em todas aulas práticas.

NORMAS DE BIOSSEGURANÇA APLICADAS À DISCIPLINA

O fundamento básico da biossegurança é assegurar o avanço dos processos tecnológicos e proteger a saúde humana, animal e o meio ambiente (Ministério do meio Ambiente).

O trabalho laboratorial executado de forma adequada e bem planejada previne a exposição indevida a agentes considerados de risco à saúde e sem dúvida evita acidentes. A esse procedimento denominamos boas práticas de laboratório. As práticas de biossegurança baseiam-se na necessidade de proteção ao operador, seus auxiliares e a comunidade local contra riscos que possam prejudicar a saúde, assim como proteger o local de trabalho, os instrumentos de manipulação e o meio ambiente.

Manipular com biossegurança, os organismos considerados contaminantes, são regidos por leis federais, estaduais e municipais.

- 1-A permanência dos alunos no laboratório de aula prática de microbiologia será apenas permitida mediante o uso de avental ou jaleco. O avental deverá estar sempre devidamente abotoado;
- 2-Não trabalhar com calçados abertos;
- 3 A entrada dos alunos no laboratório será apenas permitida após a autorização dos professores responsáveis;
- 4-Não se alimentar, beber ou fumar no laboratório;
- 5-Trabalhar com seriedade, evitando brincadeiras;
- 6-Nunca pipetar com a boca. Usar, sempre que possível, pipetadores automáticos ou pêras de borracha;
- 7-Evitar conversar durante a manipulação de cultura de microrganismos;
- 8-Não usar microscópio, caso esteja com conjuntivite;
- 9- Comunicar imediatamente ao responsável pela aula prática, caso ocorra algum acidente como derramamento de cultura bacteriana ou quebra de vidraria;
- 10-Observar os locais corretos para o descarte do material;
- 11-Lavar as mãos ao término da aula, mesmo que não tenha trabalhado com cultura de microrganismos;
- 12- Em caso de dúvida, em qualquer situação, solicitar orientação ao professor.

LABORATÓRIO E INSTRUMENTAL

1- Introdução

Todo laboratório bacteriológico, seja qual for a sua finalidade, deve obedecer a um conjunto de normas gerais, as quais são sempre comuns.

Deve possuir amplitude suficiente para abrigar comodamente os móveis, aparelhos e instrumental necessário. Paredes e pisos devem ser recobertos de material impermeável, de fácil limpeza e as mesas devem ser resistentes a ação de substâncias químicas. A iluminação natural ou artificial tem que ser abundante e difusa. As correntes de ar devem ser evitadas e a ventilação tem que ser controlada, a fim de que possa ser totalmente eliminada, quando necessário.

UEFS

2 - Instrumental

É indispensável o conhecimento do instrumental especializado exigido no trabalho bacteriológico, sendo a maioria de vidro e de outros materiais diversos.

2.1 - Tubos de ensaio

Existem tubos de ensaio de diversos tamanhos e formatos: Tubos grossos (20 x 200 mm), tubos finos (12 x 180 mm), tubos de hemólise (10 x 90 mm), Tubo de Durham (5 x 30 mm).

2.3 – Pipetas (graduadas , de Pasteur e micropipetas)

2.4 – Frascos

Balões, Erlenmeyer, Kitasato, frascos tipo conta gotas, provetas, cálice (vasos cônicos), Becker (copo graduado), garrafa de Roux

2.5 – Vidrarias Diversas

Placas de Petri, alça de Drigalsky, Funil, Gral e pistilo, lâmina de vidro, lâmina escavada, lamínula, cristalizadores, bastão de vidro, lâmpada a álcool, etc.

2.6 – Instrumental

Alça de platina, Fio ou agulha de platina, estantes para tubos de ensaio, galerias ou placa de Malassez, swab, espátulas, pinças, etc.

2.7 Aparelhos

Balança simples, balança de precisão ou analítica, estufa bacteriológica, estufa de esterilização, autoclave, banho Maria, microscópio, centrifuga, potenciômetro, contador de colônias, filtro Seitz, bico de Bunsen, micro - incinerador, destilador.

É indispensável no laboratório: capela de fluxo laminar, água corrente, caneta hidrográfica, água destilada, papel kraft, cordão, fita adesiva, algodão hidrófilo e hidrófobo.

PREPARO DE MATERIAIS PARA USO NOS TRABALHOS DE MICROBIOLOGIA

Os materiais utilizados nos trabalhos do laboratório de microbiologia, devem estar devidamente limpos e esterilizados. Para tanto, faz-se necessário o uso rigoroso de tratamentos que possibilitem a perfeita esterilização dos materiais, que vão desde sua lavagem até a esterilização propriamente dita.

LAVAGEM DE VIDRARIAS

As pipetas, frascos, placas de Petri, erlenmeyers, etc. devem ser imersos em solução sulfocrômica concentrada, a qual é capaz de dissolver qualquer sujeira, e depois lavadas com sabão neutro (a fim de não formar resíduos que poderão interferir no crescimento dos microrganismos) e enxaguados com água destilada (para que não fixe os minerais presentes na água comum).

Lavagem de lâminas e lamínulas

Ferver as lâminas e as lamínulas com uma solução de bicromato de potássio a 5% durante cerca de 1/2 hora. Adicionando a cada 10 min. Um pouco de ácido sulfúrico concentrado. Lavar abundantemente em água destilada e conservar em álcool 95° até o momento do uso.

PREPARO DAS VIDRARIAS PARA ESTERILIZAÇÃO

As vidrarias depois de lavadas de maneira adequada, devem se esterilizadas, obedecendo os seguintes procedimentos: os tubos, balões e outros devem ser embuchados com rolhas de algodão hidrófobo (não absorve água). A rolha de algodão deve ser suficientemente, porém não muito apertada. Sobre os tampões de algodão coloca-se cartuchos de papel.

As tampas das placas de Petri devem ser munidas de um disco de papel de filtro. Traçar com a tampa da placa um círculo sobre o papel de filtro, corta-lo, aplica-lo contra a face interna da tampa e ajusta-la bem. A função deste papel de filtro, é de absorver as gotículas de água que se evaporam da superfície do meio de cultura. As placas de Petri deverão ser envolvidas em papel ou acondicionadas em recipientes apropriados. As pipetas devem ser providas de algodão na extremidade destinada à aspiração e enroladas em papel ou guardadas em recipientes apropriados. Os outros objetos (alça de Drigalsky, pinça, bisturi, tesoura, bastão de vidro,etc.) devem ser mergulhados em uma solução de álcool iodado e flambados no momento do uso, repetindo este processo três vezes.

ESTERILIZAÇÃO DE VIDRARIAS

As vidrarias serão esterilizadas no forno a 160° C , durante 2 horas ou 180/ 1 h. Deixar o forno esfriar antes de abrir, pois o contrário poderá haver quebra de materiais devido a mudança brusca de temperatura. Vidrarias especiais que não puderem ser esterilizadas pelo calor (balões tarados e pipetas de precisão) serão tratadas por processos químicos (sublimados a 1° /00 ou solução de formalina a 5% e depois lavadas em água estéril.

As vidrarias com o meio de cultura, deverão ser esterilizadas na autoclave sob pressão (121° / 15 min) ou em vapor fluente (100° C / 1 h , três dias sucessivos.

PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

1 – DEFINIÇÃO: São substâncias ou complexos de substâncias capazes de dar aos microrganismos os elementos nutritivos necessários ao seu desenvolvimento. Considerando que as exigências nutritivas das bactérias variam muito, existe um grande número de meio de cultura.

2 – CLASSIFICAÇÃO:

2.1 - Quanto ao estado físico – Líquidos, Sólidos, Semi- sólidos

2.2 – Quanto aos componentes nutricionais

- Básicos – Permitem o crescimento bacteriano, sem satisfazerem especialmente nenhuma exigência características.

- Especiais – Cumprem as exigências vitais de determinados microrganismos. Geralmente são adicionados sangue, soro ou com outros nutrientes. Ex: ágar sangue

2.3 - Quanto a procedência – Naturais – Sintéticos e Semi-sintéticos

2.4 - Quanto a finalidade bacteriológica:

Diferenciais – Possuem substâncias que evidenciam a utilização de determinados substratos. Estabelecem diferenças entre microrganismos de características parecidas. Ex: Mac Conkey e Teague.

Seletivos – permitem o crescimento de um tipo particular de microrganismos ou suprimem o crescimento de outros tipos de microrganismos. Ex: ágar SS e ágar verde brilhante

Enriquecimento – favorece o crescimento da espécie desejada, mas não o crescimento das outras espécies presentes em uma população mista.

Estoque - meio pobre em nutrientes, utilizado para manter as culturas armazenadas por um determinado período de tempo.

3 – COMPOSIÇÃO DE MEIOS BÁSICOS

Caldo Simples:

Extrato de carne.....0,3%
Peptona.....1,0%
Cloreto de sódio.....0,5%
Água destilada.....100ml

Agar Sabouraud (para fungos)

Glicose40g
Peptona10g
Ágar – ágar15g
Água destilada1000 ml

3.1 - Etapas na preparação do meio

– Pesar as substâncias, juntar a água, deixar dissolver, filtrar, ajustar se necessário o pH para 7,2 a 7,4 usando ácido láctico ou hidróxido de sódio com pipeta de 1ml, gotejando aos poucos, antes da adição da ágar – ágar. Distribuir em tubos se o meio for caldo simples. Para tornar o meio sólido acrescentar ágar - ágar e colocar o meio para fundir. O meio para o cultivo de fungos o pH tem que ser ligeiramente ácido (5.4)

4 – FUNÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS:

Extrato de carne: Contém substâncias que estimulam a atividade bacteriana (fatores de crescimento) e é alimento plástico, pois vai integrar o protoplasma bacteriano. Fonte de Carbono.

Peptona: É fonte de nitrogênio

Cloreto de sódio – aumenta a pressão osmótica e mantém a isotonia do meio.

Ágar-agar: É uma substância mucilagínosa extraída de várias espécies de *Gelidium* e outras algas afins. Tem somente função de solidificar os meios, não sendo metabolizado pelas bactérias.

UEFS

5 – ESTERILIZAÇÃO

É feita a 121°C durante 15 minutos a 1 atmosfera de pressão (autoclave). Deixar esfriar a 50°C e distribuir asépticamente em placas de Petri.

6 – PROVA DE ESTERILIDADE

Os meios após a esterilização serão colocados na estufa de crescimento a 37°C, durante 24h, para comprovação da esterilidade.

7 – PROVA DE FERTILIDADE

Inocular a cultura no meio esterilizado e incubar a 37° C por 24 - 48 horas.

NOTA: Partindo-se dos meios básicos podemos preparar meios com açúcares. Os meios contendo açúcares e proteínas naturais não serão esterilizados pelo calor sobre pressão e sim pela tinalização ou pela filtração. Em se tratando de meios contendo açúcares, podemos ainda preparar soluções concentradas destes, esterilizá-las por filtração, na proporção de 1% ou 5%

ROTEIRO 3

COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM

1 – INTRODUÇÃO

A coloração é um dos passos mais importantes para a identificação bacteriana. A finalidade é facilitar a observação microscópica das bactérias e diferenciá-las quanto às suas características morfológicas.

2 – PREPARO DO ESFREGAÇO

Coloca-se no centro da lâmina, com a alça de platina estéril uma alçada do material a ser examinado e com movimentos circulares espalhamos cuidadosamente. Se o material estiver em meio sólido, colocamos previamente uma gota de solução salina estéril com a alça de platina no centro da lâmina e sobre esta uma alçada do material, misturamos e espalhamos. O esfregaço deve ser fixado pelo calor, passando a lâmina três a quatro vezes pela chama do bico de Bunsen. O aquecimento fixa e mata as bactérias do esfregaço. Deixar a lâmina esfriar.

3 – COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM

A coloração de Gram é uma das mais importantes e rotineiras em Microbiologia, É uma coloração composta e diferencial, pois permite a diferenciação de bactérias em Gram positivas e Gram negativas.

Técnica

Cobrir o esfregaço com cristal violeta durante 1 minuto, escorrer o corante e lavar rapidamente.

Cobrir a preparação com lugol, durante 1 minuto. Lavar em água corrente.

Diferenciar com álcool etílico a 95% até que não se desprenda mais corante (cerca de 30 segundos). Lavar e escorrer o excesso de água.

Cobrir a lâmina com fucsina diluída durante 30 segundos, Lavar em água corrente, escorrer, secar com papel de filtro e passar rapidamente na chama do bico de Bunsen para terminar a secagem.

Examinar em microscópio ótico utilizando objetiva de imersão (100x), com o condensador alto e o diafragma aberto

TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE ESPOROS (Endosporos) MÉTODO DE WIRTZ-CONKLIN

1 – INTRODUÇÃO

Esta coloração baseia-se no grau de afinidade que a estrutura do esporo possui ao corante, comparada com o resto da célula bacteriana, tornando possível a sua diferenciação.

O esporo bacteriano é uma parede espessa formada no interior de algumas células bacterianas. É muito resistente ao calor e a outros agentes físicos e químicos; é capaz de permanecer em estado latente por longos períodos e, em seguida, germinar, dando origem a uma nova célula vegetativa.

2 – FINALIDADE

Evidenciar a presença de esporos no interior do *Bacillus* sp.

3 – MATERIAL

Cultura em agar de *Bacillus* sp.

Soluções: Verde malaquita a 5% em água

Safranina a 1% em água

Solução fisiológica

Lâmina de microscopia e alça de platina

4 – ESFREGAÇO

Espalha-se sobre uma lâmina, com o auxílio da alça de platina, uma gota do material a ser corado. Fixar pelo calor, passando-se a lâmina (a superfície sobre a qual foi feito o esfregaço voltada para cima) sobre a chama por 3 vezes.

5 – PROCEDIMENTO TÉCNICO:

Preparar esfregaço, secar a temperatura ambiente.

Cobrir com solução de verde malaquita. Aquecer até o desprendimento de vapores por 6 minutos. (aquecer até a emissão de vapores e a partir daí iniciar a marcação do tempo) Não deixar ferver ou secar.

Lavar em água corrente, suavemente.

Cobrir com solução de safranina durante 30 segundos.

Lavar em água corrente e secar ao ar.

Examinar no microscópio com objetiva de imersão.

5 – RESULTADO

O esporo se cora na de verde, porém o resto da célula ou a célula que não possui esporo se tingem de vermelho ou róseo.

6 – INTERPRETAÇÃO

Com a ação drástica do calor sobre a célula esporulada há penetração do verde malaquita no cerne do esporo e não há descoloramento com a lavagem de água; quando se coloca a safranina, ela cora as estruturas da célula vegetativa que não conseguiram reter o verde malaquita.

TÉCNICAS GERAIS DE SEMEADURA

1 – DEFINIÇÃO

Semear um microrganismo é colocá-lo em um ambiente adequado, em meio de cultura apropriado ao seu desenvolvimento e reprodução. Ao semear um germe, é preciso levar em conta as técnicas de assepsia nas manipulações, esterilidade do instrumento e dos meios de cultura empregados.

2 – FINALIDADE

Isolar do material uma ou mais espécies microbianas, transplantar (repicar) uma cepa pura, visando conservá-la ou estudar as suas características morfológicas, culturais e bioquímicas. A semeadura, plantio ou inoculação de bactérias em meios de cultura pode ser feita mediante diversos procedimentos.

3 – NATUREZA DO INÓCULO

Secreção, fluidos orgânicos, produtos patológicos, fragmentos de tecidos, raspado de pele, amostras retiradas de alimentos, etc.

Suspensão de bactérias provenientes de crescimento em meio de cultura sólido.

Bactérias desenvolvidas em meio líquido.

Definir inóculo

4 – MEIOS DE CULTURA

Sólido- em tubo (em coluna e inclinado), em placa e em garrafa de Roux

Líquido – em balão, em tubo

Semi - sólido – em tubo

5 - TIPOS DE SEMEADURA E FINALIDADES

5.1 – PLACA

Estrias simples e estrias compostas (Agar semeado com alça de platina) – não crescem colônias isoladas

Esgotamento por Estrias (Ágar semeado com alça de platina) – Isolamento de colônias.

Disseminação – (Ágar semeado com alça de Drigalsky ou Swab) – Teste de sensibilidade – Obtenção de Antígeno

Pour- plate – (Ágar fundido resfriado a 45°C – 50°C semeado com pipeta, - Contagem de colônias.

5.2 - TUBOS

Punctura ou picada (ágar semi - sólido, sólido em coluna, semeado com agulha de platina) – Teste de Motilidade – Conservação de bactérias

Shake – tube – (Agar fundido e resfriado a 45°C- 50°C, semeado com pipeta, alça de platina)

Estrias (Agar inclinado semeado com alça ou agulha de platina) – Realização de determinadas provas bioquímicas, ativação das culturas, conservação dos microrganismos.

Meio Líquido (com alça ou pipeta) – Testes Bioquímicos, ativação da cultura

6 – LEITURA E INTERPRETAÇÃO DAS SEMEADURAS

Características do crescimento em meios líquidos - turvação, depósito, película, pigmento.

Características do crescimento em meio semi-sólido (tubo) - Observar se o crescimento ficou restrito à linha de inoculação (microrganismo imóvel). Observar se o crescimento difundiu-se ao longo da linha de inoculação (microrganismo móvel). Usualmente todo o meio encontra-se turvo.

Características do crescimento em meios sólidos

Em tubo inclinado - Observar a quantidade de crescimento: abundante, escasso, nulo, presença de pigmentos (cor) difusível ou não.

Em placas - semeado por estrias: verificar o isolamento das colônias, estudar as características em relação ao tamanho, forma, bordos, pigmentos, caracteres ópticos, dentre outros; semeados por disseminação - Crescimento confluyente; semeados por "pour - plate" - contagem de colônias.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE

O Leite é um excelente meio de cultura para vários microrganismos. Ao ser produzido nos alvéolos, ele é estéril, mas à medida que se desloca pelos canais da glândula, em direção à cisterna, pode contaminar-se com microrganismos da microbiota "normal". Algumas vezes o leite pode conter microrganismos patogênicos (*Salmonella*, *Coxiela burnetti*, *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *Brucella abortus*). A contaminação do leite pode continuar durante a ordenha, o transporte e o armazenamento. Pessoas portadoras de infecções que participam da manipulação do produto também podem representar fonte de contaminação. As condições de transporte e/ou armazenamentos também contribuem para a multiplicação dos microrganismos presentes no leite. Assim grandes populações de microrganismos degradadores (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*) podem estar presentes no leite. A qualidade do leite pode ser avaliada em função de sua microbiota, fornecendo informações que refletem as condições sob as quais o alimento foi produzido, beneficiado e/ou mantido (refrigeração e armazenamento inadequado).

PROCEDIMENTOS UTILIZADOS

1. Teste de fervura

Baseia-se no fato de que o aquecimento reduz o pH. Se um leite apresenta-se bastante alterado (pH baixo), embora com aspecto físico normal, ele coagulará ao ser aquecido, pois o pH baixa ainda mais.

- colocar 5 mL de leite num tubo de ensaio
- Ferver
- Observar se há ou não coagulação (leite alterado ou normal respectivamente)

2. Teste do álcool

Este método é particularmente útil na identificação de animais portadores de infecções (*Streptococcus*) sem manifestações clínicas. Animais infectados levam à coagulação do leite, neste teste, que pode aparecer rapidamente ou demorar de quatro a seis horas, quando as alterações são pequenas.

- Colocar 5 mL de leite num tubo de ensaio
- Adicionar 5 mL de álcool 70%
- Observar se há ou não coagulação (leite alterado ou normal, respectivamente)

3. Teste do azul de metileno

O crescimento de microrganismo no leite provoca o consumo do oxigênio presente no meio. Esse fenômeno leva à produção de substâncias redutoras, diminuindo o potencial óxido-redutor (O/R). Através de uma substância indicadora, é possível acompanhar ou medir essa diminuição do potencial O/R.

O corante azul de metileno é um exemplo de substância indicadora. Em sua forma oxidada ele apresenta de cor azul, e, em sua forma reduzida, ele é incolor (leuco azul de metileno). Quando introduzido numa cultura bacteriana, ou em qualquer meio contendo bactérias, o azul de metileno age como acceptor de elétrons, ou seja, sofre redução, tornando-se incolor. A velocidade dessa transformação é diretamente proporcional à concentração bacteriana no meio. É possível, dessa forma, avaliar a concentração bacteriana no meio pela adição desse corante e pela determinação do tempo de descoloramento.

UEFS

Tabela 3 – Relação entre o tempo de descoramento do leite e o número de bactérias após a adição de azul de metileno

Tempo de descoramento	UFC/mL	Qualidade
< 20 minutos	$> 2,0 \times 10^7$	péssima
20 minutos – 2 horas	$4 \times 10^6 - 2,0 \times 10^7$	má
2 horas – 5,5 horas	$5 \times 10^5 - 4 \times 10^6$	regular
> 5,5 horas	$< 5 \times 10^5$	boa

- Pipetar para um tubo de ensaio 10 mL do leite a ser testado
 - Juntar 1 mL de azul de metileno (0,02%)
 - Misturar e colocar na estufa a 37° C. Anotar o horário de início.
 - Fazer a primeira leitura após 20 minutos e as seguintes a cada 30 minutos.
- Considera-se um teste positivo quando a cor do fundo do tubo estiver branca

4. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas (*pour plate*)

No aspecto quantitativo procura-se avaliar a população de um modo geral

- Preparar uma diluição decimal em série até 10^5 .
- Inocular as placas em duas repetições com 1 mL das diluições de 10^3 a 10^5 .
- Verter nas placas o meio Agar padrão para contagem (PCA) a 45° C
- Homogeneizar, deixar solidificar, inverter e incubar por 48h a 37° C.
- Proceder a contagem

Tabela 2 – Limite de tolerância para os diferentes tipos de leite. * Excluído na RDC 12

Tipo de leite	<i>Salmonella sp</i>	Coliformes totais*	Coliformes fecais	Contagem padrão em placas*
	Ausência em	NMP/mL	NMP/mL	UFC/mL
A	25 mL	1	Ausência	2×10^3 /mL
B	25/mL	4	1	8×10^4 /mL
B	25/mL	10	2	3×10^5 /mL

ROTEIRO 7

PREPARA DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS PARA ANÁLISES: DILUIÇÃO E PLAQUEAMENTO

- ✓ AMOSTRAS LÍQUIDAS
 - 1- Amostras líquidas em frascos com espaço suficiente para agitação devem ser misturadas antes da retirada da unidade analítica, invertendo-se a embalagem 25 vezes
 - 2- Antes de abrir a embalagem, limpar a área externa com etanol 75%, para remoção dos contaminantes presentes
 - 3- Amostra direta – transferir assepticamente 1,0 mL ou 10 mL das amostras para o meio em questão
 - 4- Amostra diluída - diluições seriadas: 10^{-1} – transferir assepticamente uma porção de 1,0mL da amostra para 9,0 mL de diluente (água salina peptonada 0,1% ou tampão fosfato pH 7,2), para a preparação da segunda diluição (10^{-2}) , transferir assepticamente 1,0 mL da diluição 10^{-1} para 9,0mL de diluente. As diluições subsequente(10^{-3} , 10^{-4} etc.) são obtidas de maneira similar, transferindo-se 1,0 mL da diluição anterior para 9,0 mL de diluente. Antes de retirar o volume a ser transferido, agitar o tubo no agitador tipo “vortex” ou inverter o tubo 25 vezes. **Usar sempre uma pipeta diferente para cada diluição**

- ✓ AMOSTRAS SÓLIDAS
 - 1- Antes de abrir a embalagem, limpar a área externa com etanol 75%, para remoção dos contaminantes presentes

UEFS

- 2- A unidade analítica utilizada na maioria dos alimentos sólidos é 25g. Retirar assepticamente a amostra e transferir para um triturador (liquidificador), contendo 225 mL do diluente. Triturar e homogeneizar por 60 segundos. Transferir o material diluído (10^{-1}) para um erlenmeyer de 500mL e proceder as diluições subseqüentes (10^{-2} , 10^{-3} etc) utilizando tubos com 9,0mL do diluente.

OBS: O número de diluições requeridas dependerá do nível de contaminação esperado. Caso não haja possibilidade de se estimar o nível de contaminação da amostra, deve-se preparar e inocular amostra direta (10^0 em caso de amostra líquida) seguindo a diluição 10^{-1} até a diluição 10^{-7}

TÉCNICA DO PAQUEAMENTO EM PROFUNDIDADE “ POUR PLATE”

- 1- Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular 1,0mL de cada diluição em placas de Petri estéreis. (realizar este procedimento em duplicatas)
- 2- Verter nas placas inoculadas \pm 20 mL do agar requerido para a análise, previamente fundido e resfriado a 45° C. Misturar o inoculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, numa superfície plana e seca, em movimentos circulares (4 vezes no sentido horário, 4 vezes no sentido anti-horário e 4 vezes na forma de oito).
- 3- Esperar solidificar o meio. Inverter as placas e incubar nas temperaturas requeridas

ROTEIRO 8

CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS

1. Preparar diluições de 10^{-1} ate 10^{-7} da amostra (No caso da amostra líquida começar com a amostra direta 10^0)
2. Inocular 1,0mL de cada diluição em placas de Petri estéreis. (realizar este procedimento em duplicatas)
3. Verter nas placas inoculadas \pm 20 mL do Agar Padrão para Contagem (PCA), previamente fundido e resfriado a 45° C. Homogeneizar. Esperar solidificar

Contagem total de aeróbios mesófilos

1. Incubar as placas invertidas a 35° C/48h. Contar todas as colônias

Contagem total de aeróbios psicrotófilos

2. Incubar as placas invertidas a 7° C/10 dias . Contar todas as colônias

Contagem total de aeróbios termófilos

3. Incubar as placas invertidas a 55° C/24 h . Contar todas as colônias

Contagem das colônias: Selecionar as placas que tenha entre 25 a 250 colônias. Calcular o número de unidades formadora de colônia (UFC) por mL ou grama , multiplicar pelo inverso da diluição inoculada .

Ex: 100 colônias na diluição 10^{-2} = 100×10^2 = 10 000 = $1,0 \times 10^4$ UFC/g ou mL

Contagem de bolor e levedura

1. Preparar diluições de 10^{-1} ate 10^{-6} da amostra (No caso da amostra líquida começar com a amostra direta 10^0)
2. Inocular 0,1 mL de cada diluição nas placas contendo o meio solidificado Agar batata dextrosado (PDA)

UEFS

3. Incubar as placas não invertidas a 25° C ou temperatura ambiente por 5 dias (contar primeiro com 3 dias).
4. Contagem das colônias: Selecionar as placas que tenha entre 15 a 150 colônias. Calcular o número de unidades formadora de colônia (UFC) por mL ou grama , multiplicar pelo inverso da diluição inoculada e depois por 10 (já que foi inoculado 0,1 ml e não 1 ml)

Ex: 100 colônias na diluição $10^{-2} = 100 \times 10^2 = 10\ 000 \times 10 = 1,0 \times 10^5$ UFC/g ou mL

ROTEIRO 9

CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

A utilização de meios acidificados a pH $3,5 \pm 0,1$ promove seletivamente o crescimento de fungos, inibindo a maioria das bactérias presentes no alimento.

- PROCEDIMENTOS

- Inocular 0,1 mL das diluições selecionadas sobre a superfície seca de ágar batata glicose 2% acidificado com ácido tartárico a pH 3,5.

Com o auxílio de alça de Drigalski , espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção.

Nos casos em que a legislação exigir valores menores que 100 UFC/g ou mL, distribuir em duplicata 1 mL da diluição 10^{-1} em 3 placas (0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL). No caso de produtos líquidos poderá ser inoculado 0,1 mL diretamente da amostra (10^0), o que corresponderá à diluição 10^{-1} .

- Incubação: Incubar as placas, sem inverter, a 25° C por 5 a 7 dias, em incubadora de B.O.D.
- Leitura: Selecionar as placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

ROTEIRO 10

CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS (37° C) E COLIFORMES FECAIS (45° C ou termotolerante)

A contagem de coliformes) é baseada nas características do grupo: bastonete Gram-negativo, que produzem ácido e gás a partir de lactose.

Coliformes Totais: Habitat intestinal e ambiental: *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*

Coliformes Fecais: Habitat exclusivamente intestinal: *Escherichia coli*

Procedimento:

Método: tubos múltiplos (Número mais provável – NMP)

1. Teste presuntivo

Presume-se que os microrganismos que crescem e produzem gás a partir da lactose sejam coliformes

Meio de enriquecimento: caldo lauryl sulfato triptose

- Inocular três tubos (tubos de Durham invertido no seu interior) contendo 10 mL de caldo lauryl sulfato triptose (dupla concentração) com 10 mL da amostra .
- Inocular três tubos (tubos de Durham invertido no seu interior) contendo 10 mL de caldo lauryl sulfato triptose (concentração normal) com 1m L da amostra.

UEFS

- Inocular três tubos (tubos de Durham invertido no seu interior) contendo 10mL de caldo lauryl sulfato triptose (concentração normal) com 0,1 mL da amostra
- Incubar a bateria com as séries te tubos a 37° C/48h
- Fazer a leitura, considerando positivos os tubos com presença de gás no interior dos tubos de Durham

3- Teste confirmativo

Coliformes Totais

Meio seletivo caldo lactosado – bile verde brilhante. Neste meio, os sais de bile têm a função de inibir o crescimento de bactérias não entéricas e o verde brilhante de inibir as bactérias Gram-positivas,selecionando desta forma os coliformes.

- Imediatamente após a leitura do teste presuntivo,transferir com uma alça de platina uma alíquota de cada tubo positivo para tubos (tubos de Durham invertidos no seu interior) contendo caldo lactosado bile verde brilhante.
- Incubar a 35° C por 48h
- Fazer a leitura identificando como positivos os tubos com gás.
- Usar a tabela de NMP para verificar qual o número mais provável de coliformes totais por grama ou mL.

Coliformes Fecais

Os coliformes fecais têm em seu ambiente natural (trato intestinal) temperaturas mais elevadas. Eles são capazes de crescer a 44,5° C, possibilitando, assim,de uma forma prática, serem avaliados separadamente.

- Imediatamente após a leitura do teste presuntivo, transferir com a alça de platina uma porção de cada tubo positivo para tubos contendo caldo EC (*Escherichia coli*) (tubos de Durham invertido no seu interior).
- Incubar a 44,5 (pescado) ou 45° C por 24h. Utilizar o banho-maria

Fazer leitura identificando como positivo os tubos com gás

Usar a tabela de NMP para verificar qual o número mais provável de coliformes fecais/g ou mL

ROTEIRO 11

PESQUISA de *Salmonella sp*

Todas as salmonelas são consideradas potencialmente patogênicas para o homem.A única via de entrada destes microrganismos no corpo humano é a oral, por isso é de suma importância a análise dos alimentos para detectar sua presença.

A metodologia recomendada segue 4 etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimentos

Pré- enriquecimento em caldo não seletivo; objetiva a recuperação de células injuriadas

- Adicionar 25g ou mL da amostra em 225 mL do caldo de pré- enriquecimento (diluição 10^{-1}). Homogeneizar no liquidificador por 60 seg. Verter todo material em erlenmyer estéril e incubar a 35° C/ 24h. Para uso geral recomenda-se o caldo lactosado ou a água peptonada 0,1% tamponada e para produtos lácteos água destilada verde brilhante.

Enriquecimento Seletivo: estimula a multiplicação de salmonelas e reduz ou inibe o crescimento dos organismos competitivos, tais como coliformes, *Proteus* e *Pseudomonas*

- Transferir 1,0 mL para 10mL de caldo Tetrionato (TT) .Incubar a 35° C/24h.

UEFS

Plaqueamento seletivo diferencial: Objetiva promover o desenvolvimento preferencial de colônias de Salmonella, com características típicas que as distingam dos competidores, para posterior confirmação sorológica e bioquímica.

- Agitar o tubo de enriquecimento seletivo e estriar uma alçada do caldo tetrionato em placas de Agar entérico de Hectoen (HE) e Ágar xilose lisina descarboxilado (XLD). Incubar as placas invertidas a 35° C/24h. Verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de Salmonella:

Agar HE: colônias transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto.

Agar XLD: colônias transparentes, cor de rosa escuro, com ou sem centro preto.

Confirmação Preliminar das colônias típicas de Salmonella

Com o auxílio de uma agulha de inoculação, remover uma porção da massa de células, do centro da colônia típica (no mínimo 2 colônia) e semear em tubos inclinados de Agar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar.. A semeadura deve ser feita por picada e estrias na rampa. Incubar os tubos a 35° C/24h. Observar reação típica:

TSI- rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do agar). Reação atípica que não deve ser descartada se as demais reações em LIA se apresentarem típicas: rampa e fundo ácidos (amarelos), com ou sem produção de H₂S.

LIA – fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S. Reação atípica, que não devem ser descartada se as demais reações em TSI se apresentarem típicas: fundo amarelado com rampa alcalina, com ou sem produção de H₂S.

Teste bioquímico

. Meio SIM – Transferir com uma agulha através de picada a cultura de colônia típica do TSI para o meio. Incubar 35° C/24h.

. Produção de H₂S: escurecimento do agar. Salmonella pode produzir ou não H₂S

. Motilidade : crescimento na região da picada – imóvel

crescimento em todo agar ou ao redor da região da picada: móvel. Salmonella é móvel

Após a leitura do H₂S e da motilidade, adicionar 5 gotas de reativo de Erlich ou Kovacs no tubo.

Aparecimento de cor rósea: indol positivo.

Aparecimento de cor amarelado: indol negativo. Salmonella é indol negativo

Teste do vermelho de metila (VM) 3 Voges-Proskauer (VP): Transferir uma alçada com inoculo da cultura em TSI, para dois tubos com caldo 3mL VM-VP e incubar a 35° C/48h para VP e 96h VM. Após o período de incubação, no tubo VP adicionar 1,8 mL de solução de alfa naftol 5% e agitar. Adicionar em seguida 0,6 mL de solução KOH 40%, agitar. Observar até 1 hora.

Desenvolvimento de cor vermelha ou rosea – teste positivo

Permanência do meio na cor do reagente (amarelado ou ligeiramente esverdeado) – teste negativo. A maioria das Salmonelas são VP negativas

No tubo VM – adicionar 5 gotas de solução vermelho metila e observar imediatamente se o meio adquire uma coloração vermelha – teste positivo ou amarela _ teste negativo. A maioria das cepas de Salmonella são VM positivas.

Teste do citrato:

Com uma agulha de inoculação, transferir um inoculo da cultura para um tubo de agar citrato de Simmons inclinado, estriando a rampa e picando o fundo. Incubar a 35° C/ 96h. Observar o crescimento:

Cor azul: citrato positivo: a maioria das cepas de Salmonelas são citrato positivo

Cor do meio inalterado: citrato negativo

Teste de urease:

transferir uma alçada da cultura crescida no TSI para um tubo com caldo uréia de Christensen.

Incubar 35° C/24h. Observar crescimento

Cor do meio original (pêssego): teste negativo. A maioria das cepas de Salmonelas são ureases negativa

Cor do meio rosa escuro: teste positivo

Teste da descarboxilação da lisina em caldo

Transferir uma alçada da cultura em TSI para um tubo com caldo lisina (previamente des aerado). Cobrir a superfície do caldo com 2 q 3 ml de parafina ou óleo mineral estéril. Incubar

UEFS

a 35° C /48h h. Observar:

Alteração do meio de esverdeado para púrpura azulado : teste positivo- As cepas de Salmonelas são lisinas positivas

. alteração do meio par cor amarela (ácida): teste negativo.

Reação sorológica frente ao anti-soro polivalente "O"

Ressuspender o cultivo obtido em ágar estoque inclinado (de 18 a 24 horas) em aproximadamente 2 mL de solução salina 0,85%.

Em lâmina de vidro, placa de Petri ou placa de Huddleson, depositar separadamente uma gota de solução salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente "O", diretamente do frasco.

Em seguida, acrescentar a cada uma delas uma gota da suspensão em teste.

Com movimentos circulares, realizar a leitura com iluminação sobre fundo escuro em 1 a 2 minutos.

Classificar a reação do seguinte modo:

Positiva: presença de aglutinação somente na mistura cultivo + anti-soro;

Negativa: ausência de aglutinação em ambas as misturas;

Não específica: presença de aglutinação em ambas as misturas (formas rugosas).

ROTEIRO 12

CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus*

A contagem de *S. aureus* em alimentos pode ser feita com dois objetivos, um relacionado com a saúde pública, para confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, e outro relacionado com o controle de qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, condição em que *S. aureus* serve como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanificação das superfícies destinadas ao contato com alimentos.

Método: Contagem direta em placa

Procedimento:

- Inocular 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas de agar Baird-Parker (BP). Espalhar o inóculo com uma alça de Drigalski, até que todo o excesso de líquido seja absorvido. Se as contagens estimadas de *S. aureus* na amostra forem menores do que 100/g ou mL, inocular 1,0 mL da primeira diluição, distribuindo o volume por quatro placas, 3 com 0,3 e uma com 0,1 mL.

- Incubar invertidas a 37° C por 48h.

- Contar as colônias típicas de *S. aureus* selecionando as placas que tenha entre 25 a 250 colônias.

Colônias típicas: colônias circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca.

Colônias atípicas: cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos.

Confirmação das colônias

- Selecionar no mínimo cinco colônias típicas, para teste de coagulase, e havendo menos do que cinco tomar todas. Se a placa apresentar colônias suspeitas de mais de um tipo, típicas e atípicas, selecionar pelo menos cinco de cada tipo. Transferir cada colônia para um tubo de caldo infusão cérebro coração (BHI), emulsionar bem a massa de células com o caldo, transferir uma alçada para um tubo com agar tripticase de soja (TSA) inclinado e incubar ambos os tubos a 35° C/24h.

Teste da coagulase:

Transferir 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho.

Incubar a 36 ± 1°C por 6 horas.

Verificar a presença de coágulos, considerando os critérios a seguir:

Reação negativa: não formação de coágulo;

Reação 1+ : coágulo pequeno e desorganizado;

Reação 2+ : coágulo pequeno e organizado;

Reação 3+ : coágulo grande e organizado;

Reação 4+ : coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprenderá quando o

UEFS

tubo for invertido;

Quando a reação de coagulação for do tipo 3+ e 4+, considerar a prova positiva para *Staphylococcus aureus*;

Quando a reação de coagulação for negativa, considerar a prova negativa para *Staphylococcus aureus*.

Quando a reação for duvidosa do tipo 1+ e 2+, repicar do mesmo caldo de cultura para um tubo contendo ágar estoque ou outro contendo caldo BHI. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, para a realização dos testes complementares:

Testes complementares: A partir da cultura pura em BHI ou ágar estoque, realizar as seguintes provas confirmativas:

Coloração de Gram: Preparar esfregaço e corar pelo método de Gram.

A ausência de cocos Gram positivos indica teste negativo para *Staphylococcus aureus*. A presença de cocos Gram positivos indica a necessidade da realização de testes complementares.

Pesquisa de termonuclease: Fazer orifícios eqüidistantes com cerca de 2 mm de diâmetro no ágar para ensaio de termonuclease ou no ágar azul de toluidina - DNA, em placas previamente preparadas.

Colocar os tubos das culturas, mantidos em caldo BHI, em banho-maria fervente por 15 minutos.

Deixar esfriar e preencher completamente um orifício para cada cultivo a ser analisado.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas ou a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas.

O aparecimento, ao redor dos orifícios, de um halo rosa no ágar azul de toluidina ou de um halo de clarificação no agar para ensaio de DNase com verde de metila, será indicativo de reação positiva para termonuclease.

Considerar como positivas as culturas que apresentarem halo de diâmetro superior a 1 mm. O *Staphylococcus aureus* é termonuclease positiva.

Prova da catalase: Com auxílio de alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou Pipeta de Pasteur, estéreis, retirar uma alíquota do cultivo em ágar estoque e transferir para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.

Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase.. A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase.

O *Staphylococcus aureus* é catalase positiva.

RESULTADOS

Quando o número de colônias confirmadas for igual ao número de colônias selecionadas e repicadas, o resultado será igual à contagem inicial, levando-se em consideração a diluição utilizada.

ROTEIRO 13

CONTAGEM DE *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é aeróbico formador de esporos e se encontra normalmente presente no solo, poeira e água e alimentos com baixo aw. Os alimentos envolvidos são pratos a base de cereais e hortaliças.

. PROCEDIMENTOS

Inoculação

- Inocular sobre a superfície seca do ágar MYP (Polimixina gema de ovo) ,0,1 mL de cada diluição selecionada.Com auxílio de alça de Drigalski, espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio até completa absorção.Nos casos em que for necessária a obtenção de resultado menor que 100 UFC/g ou mL distribuir 1 mL da diluição 10^{-1} em 3 placas (0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL). No caso de amostras líquidas, poderá ser inoculado 0,1 mL diretamente da amostra.

- Incubação: Incubar as placas invertidas a 30 por 30 a 48 horas.

- Leitura: Selecionar as placas que contenham entre 15 e 150 colônias. Contar as colônias

UEFS

rodeadas por um halo de precipitação opaco sobre um fundo róseo, no ágar MYP.

- Selecionar 3 a 5 colônias típicas e semeá-las em tubos com ágar nutriente inclinado.
- Incubar a 35°C por 24 horas.
- De cada tubo, fazer esfregaço e corar pelo método Gram para verificar a presença de bastonetes curtos Gram positivos, com extremidades quadradas dispostos em cadeias. Os esporos são centrais ou sub-terminais.
- Das culturas puras em ágar estoque inclinado, realizar as seguintes provas:

Identificação Bioquímica

- Motilidade e redução de nitrato

Inocular, com agulha, tubos contendo ágar motilidade-nitrato. Incubar a 35° C por 18 a 24 horas.

Após incubação, verificar o tipo de crescimento presente.

Culturas imóveis mostram crescimento apenas na linha de inoculação, enquanto que as móveis crescem de forma difusa. O *Bacillus cereus* em 50 a 90% dos casos mostra-se móvel.

Após a leitura da motilidade, adicionar aos tubos 2 a 3 gotas de alfa naftilamina 0,5% e 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico 0,8%. O aparecimento de coloração rosa indica positividade para redução de nitrato. O *Bacillus cereus* reduz o nitrato a nitrito.

- â-hemólise em ágar sangue de carneiro.

Inocular por estria em placa com ágar sangue de carneiro.

- Incubar a 35° C por 24 horas. Observar a produção de â-hemólise característica do *Bacillus cereus*.

Bacillus cereus é produtor de â-hemólise.

- Crescimento rizóide: Inocular com alça sobre a superfície seca de ágar nutriente, depositando o inóculo no ponto central da placa.

- Incubar a 35 por 48 a 72 horas.

- Após incubação verificar o tipo de crescimento: Crescimento rizóide se caracteriza pelo aparecimento de colônias com longas extensões em forma de raízes ou longos fios, típicas de *Bacillus mycoides*. O *Bacillus cereus* não apresenta crescimento rizóide, porém algumas cepas podem apresentar colônias rugosas em forma de galáxia.

- RESULTADOS

Calcular o número de *Bacillus cereus* multiplicando o número de colônias confirmadas, nas provas confirmativas, pelo fator de diluição usado.

ROTEIRO 14

CONTAGEM DE *Clostridium* SULFITO REDUTORES E DE *Clostridium perfringens*

A partir das diluições escolhidas, semear alíquotas de 1 mL em placas estéreis e adicionar cerca de 15 mL de ágar TSC ou SFP em temperatura de 46 - 48°C.

Homogeneizar cuidadosamente e deixar solidificar em superfície plana.

Após, adicionar uma segunda camada de cerca de 10 mL do mesmo meio.

Deixar solidificar em superfície plana.

Incubação: Imediatamente após a solidificação do ágar, incubar as placas (sem inverter), em jarra de anaerobiose a 35°C por 18 a 24 horas.

Seleção e Isolamento: As colônias típicas de *Clostridium* sulfito redutores são negras e de tamanho variável de 1 a 3 mm no ágar TSC.

Selecionar placas que contenham entre 25 e 250 colônias típicas.

Contar todas as colônias negras presentes. Anotar o resultado.

Esse resultado, multiplicado pela diluição usada, corresponde ao número de *Clostridium* sulfito redutores presentes por grama da amostra em análise.

RESULTADOS

Calcular o número de *Clostridium* sulfito redutores multiplicando o número de colônias negras contadas no ágar TSC pelo fator de diluição usado

<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">ROTEIRO 15</td> </tr> </table>	ROTEIRO 15
ROTEIRO 15	

NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE *Vibrio parahaemolyticus*

PROCEDIMENTOS

Provas presuntivas

Inoculação em caldo de enriquecimento seletivo: A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetuar as demais diluições desejadas em Caldo peptonado sal 3% (no mínimo mais duas diluições). Inocular volumes de 1 mL de cada uma das diluições desejadas em séries de 3 tubos contendo GSTB . Incubar os tubos a 35 °C por 18 horas a 24 horas.

Leitura: A presença de turvação do meio indica a suspeita da presença de *Vibrio parahaemolyticus*.

Anotar o número de tubos de cada série que apresentaram turvação.

Isolamento em ágar tiosulfato citrato sais biliares (TCBS)

Inoculação: A partir de cada tubo de GSTB que apresentar turvação, sem agitá-lo e com auxílio de uma alça de níquel-cromo, de platina ou descartável estéril, retirar uma alçada do crescimento da superfície e estriá-la sobre a superfície seca de ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS). Incubar as placas em posição invertida a 35°C por 24 horas.

Leitura: Verificar o aparecimento de colônias arredondadas, opacas, de cor azul esverdeada, com 2 a 3 mm de diâmetro, típicas de *Vibrio parahaemolyticus*.

Quando não houver colônias suspeitas, o resultado será negativo para o tubo de origem.

Provas preliminares para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

De cada placa, selecionar de 2 a 3 colônias típicas e transferi-las simultaneamente para tubos contendo caldo peptonado sal 3% e ágar nutriente sal 3% inclinado. Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.

Coloração de Gram: A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3%, proceder à coloração de Gram . O *Vibrio parahaemolyticus* se apresenta como bastonetes retos ou curvos Gram negativos. Em culturas antigas, pode se apresentar em forma de cocobacilos.

Crescimento com 8% de sal e sem sal: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, transferir, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, uma alçada para um tubo contendo caldo peptonado sem sal e caldo peptonado sal 8%.

Incubar os tubos a 35°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, verificar a presença de turvação indicativa da ocorrência de crescimento. O *Vibrio parahaemolyticus* não cresce no meio sem sal e cresce no meio com 8% de sal.

Prova da oxidase: A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3%, usando palitos de madeira, de plástico descartáveis, pipetas Pasteur, ou alça de platina, realizar a prova de oxidase espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase ou sobre tiras de papel para teste de oxidase, comercialmente disponíveis.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após este tempo, podem ocorrer reações falso-positivas.

O aparecimento de cor azul (quando é usado o reativo N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou de cor vermelha intensa (quando o reativo usado é o oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva.

OBS: Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço para realizar a prova de oxidase, pois traços de óxido de ferro na superfície flambada podem produzir reação falso-positiva.

O *Vibrio parahaemolyticus* é oxidase positiva

Caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, inocular, com auxílio de alça de níquel-cromo, um tubo contendo caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%.

Cobrir o meio com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéreis.

Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio, de vermelho para amarelo, devido à fermentação da sacarose e produção de ácido.

O *Vibrio parahaemolyticus* não altera a coloração do meio pois não é capaz de fermentar a sacarose.

Ágar Kligler ferro sal 3%

A partir do cultivo mantido no ágar nutriente sal 3% inclinado, com auxílio de agulha de platina

UEFS

ou níquel-cromo, inocular, mediante picada central em toda a profundidade do ágar e estriando a superfície inclinada, tubos com ágar TSI sal 3% ou ágar Kligler ferro sal 3%. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

O *Vibrio parahaemolyticus* apresenta base ácida (amarela), sem gás, sem produção de H₂S e bisel alcalino (vermelho).

Provas adicionais para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

As colônias que apresentarem comportamento compatível com *V. parahaemolyticus* nas provas preliminares, deverão ser submetidas às provas adicionais, conforme descrito em 5.5.1 a 5.5.9.

Teste do crescimento a 42°C: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo peptonado sal 3%. Incubar a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a presença de turvação dos meios.

O *vibrio parahaemolyticus* cresce à temperatura de 42°C.

Ágar gelatina sal 3%: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular uma placa de Petri contendo ágar gelatina sal 3% (cada placa pode ser dividida em até 6 setores e cada cultivo pode ser inoculado no centro de cada setor). Incubar as placas a 35°C por 18 a 24 horas.

Colocar as placas em refrigeração por alguns minutos antes e realizar a leitura, o que facilita a visualização do halo.

O aparecimento de um halo opaco ao redor do crescimento indica a presença da gelatinase.

O *Vibrio parahaemolyticus* é gelatinase positiva.

Teste da motilidade: A partir da cultura mantida no ágar nutriente sal 3% inclinado, com auxílio de agulha de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, através de picada central, inocular um tubo contendo ágar motilidade sal 3%. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Um crescimento bacteriano difuso ao redor da picada caracteriza motilidade positiva.

O *Vibrio parahaemolyticus* apresenta motilidade positiva.

Prova de Hugh-Leifson glicose (OF): A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3% , inocular, com auxílio de agulha de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, dois tubos contendo meio OF glicose (Hugh-Leifson) sal 3%.

Cobrir um dos tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril. Incubar a 35°C/24h

Após o período de incubação, verificar a viragem de cor dos meios de verde para amarelo e a presença de bolhas de gás nos meios.

A cor amarela nos dois tubos significa fermentação da glicose.

A presença de cor amarela somente no tubo sem óleo mineral significa utilização oxidativa da glicose.

O *Vibrio parahaemolyticus* fermenta a glicose sem produção de gás, ou seja, os dois tubos devem apresentar coloração amarela.

Descarboxilação da lisina: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo Caldo vermelho de fenol lisina sal 3%.

Inocular também um tubo contendo meio base (sem adição do aminoácido) que servirá de controle.

Cobrir os tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril.

Incubar a 35°C por, no máximo, 4 dias, juntamente com um tubo de Caldo vermelho de fenol lisina sal 3% não inoculado, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias.

Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose, e, ocorrendo a descarboxilação da lisina, o meio retorna à cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono.

O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer.

O *Vibrio parahaemolyticus* descarboxila a lisina.

Hidrólise da arginina: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo arginina sal 3%.

Inocular também um tubo contendo o meio base (sem adição do aminoácido) que servirá de controle.

Cobrir os tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril.

Incubar a 35°C por, no máximo, 4 dias, juntamente com um tubo de caldo arginina sal 3% não inoculado, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias.

Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose, e, ocorrendo a hidrólise da arginina, o meio retorna a cor púrpura devido à produção de

UEFS

aminas primárias e dióxido de carbono.

O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer.

O *Vibrio parahaemolyticus* não hidrolisa a arginina.

Prova da fermentação do manitol e arabinose: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol manitol sal 3% e outro tubo contendo caldo vermelho de fenol arabinose sal 3%.

Cobrir o meio com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril. Incubar a 35°C por 24 h

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração dos meios de vermelho para amarelo, devido à fermentação dos açúcares e conseqüente produção de ácido.

99% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fermenta o manitol.

50% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fermenta a arabinose.

Teste do halofilismo: A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular tubos contendo caldo peptonado sal 6% e 10%. Incubar a 35°C por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a presença de turvação nos meios.

O *Vibrio parahaemolyticus* cresce a 6% de sal e não cresce, ou apresenta crescimento discreto, a 10% de sal.

RESULTADOS

Serão consideradas como positivas para *Vibrio parahaemolyticus*

as culturas que apresentarem os seguintes resultados nas provas adicionais de identificação:

Motilidade - positiva

Hugh Leifson (OF) - glicose fermentativo

Descarboxilação da lisina - positivo

Hidrólise da arginina - negativo

Crescimento a 42°C - positivo

Fermentação do manitol - positivo

Fermentação da arabinose - positivo

Ágar gelatina sal 3% - crescimento com formação de halo

Halofilismo (6% sal) - positivo

Halofilismo (8% sal) - positivo

Halofilismo (10% sal) - negativo ou crescimento discreto

A partir da combinação de tubos com resultado positivo em cada série, calcular o Número Mais Provável. Expressar o valor obtido em NMP/g.