



Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos - CTAA



Manual de microbiologia de alimentos

Regina Silva de Siqueira

R
576 163.
SG19 m
1995

Serviço de Produção de Informação - SPI

Brasília - DF

1995

© EMBRAPA

ISBN 85-85007-09-5

Exemplares desta publicação podem ser solicitados ao
Serviço de Produção de Informação - SPI
SAIN Parque Rural - W/3 Norte (Final)
Fone: (061) 348-4236
Telex: (061) 1738
Fax: (061) 272-4168
Caixa Postal: 04031
CEP 70770-901 Brasília - DF

CTAA
Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
Telefone: (021) 410-1353
Telex: 21 33267 EBPA-BR
Fax: (021) 410-1090
CEP: 23020-470 - Rio de Janeiro, RJ

Tiragem: 3.000 exemplares

Comitê de Publicações:

Hilda da Rosa Rodrigues
Fénelon do Nascimento Neto
Midori Koketsu
Rogério Germani
Rosa Rabinovitch Szpiz
Tânia Barreto Simões Correa
Viktor Christian Wilberg
Maria Ruth Martins Leão

Revisão: Prof. Paschoal G. Robbs
Prof. Valdir Favarini

Fotografia: Jarbas Moraes Pacheco

Projeto gráfico e ilustração da capa: Mayara Rosa Carneiro
Editoração eletrônica: José Ilton S. Barbosa
Desenhos dos esquemas: Fernando M. Ribeiro
Coordenação editorial: Terezinha Santana G. Quazi
Fotolito, impressão e acabamento: EMBRAPA/SPI

Agradecimento:
Equipe do ACQA/CTAA

CIP - Brasil. Catalogação - na - publicação
Serviço de Produção de Informação (SPI) da EMBRAPA.

Siqueira, Regina Silva de.

Manual de microbiologia de alimentos / Regina Silva de Siqueira ; EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). Brasília: EMBRAPA-SPI ; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995.

159p.

1. Alimentos - Microbiologia - Manual. I. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ).
II. Título.

CDD 576.163

Embrapa

Unidade:	CTAA
Valor aquisição:	-
Data aquisição:	04.12.2002
N.º N. Fiscal/Fatura:	-
Fornecedor:	-
N.º OCS:	-
Origem:	EMB UPC
N.º Registro:	2002.00007

Apresentação

O Manual de Microbiologia de Alimentos, resultado de um exaustivo trabalho da pesquisadora Regina Silva de Siqueira, representa uma importante contribuição da EMBRAPA / CTAA para a disseminação e avanço do uso das técnicas de análise microbiológica na indústria de alimentos do Brasil.

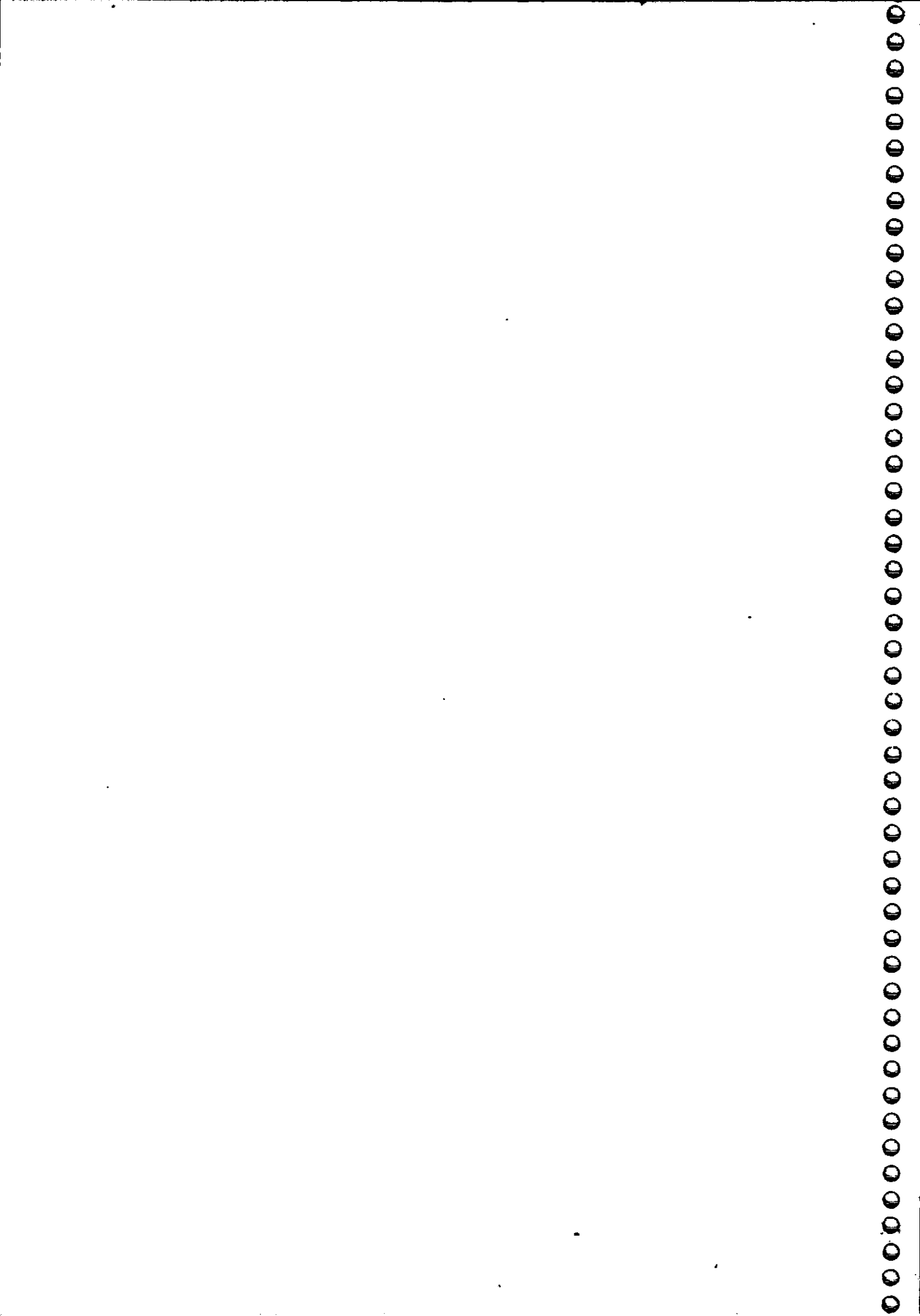
Pretende-se oferecer uma obra de referência, tanto para o analista dos laboratórios de controle de qualidade de alimentos, quanto para estudantes, cuja formação envolva o conhecimento e o uso de técnicas analíticas microbiológicas.

A acurada e extensiva exposição dos principais métodos e técnicas de análise disponíveis, a par da alta qualidade das ilustrações, obra do fotógrafo Jarbas Moraes Pacheco, dá à microbiologia de alimentos um tratamento singular, em língua portuguesa.

É, portanto, com satisfação, que a EMBRAPA / CTAA oferece à comunidade técnica e universitária do Brasil esta obra, que certamente se provará valiosa também para o ensino e a indústria de alimentos dos demais países de língua portuguesa.

Luís Fernando Vieira

Chefe do CTAA



Sumário

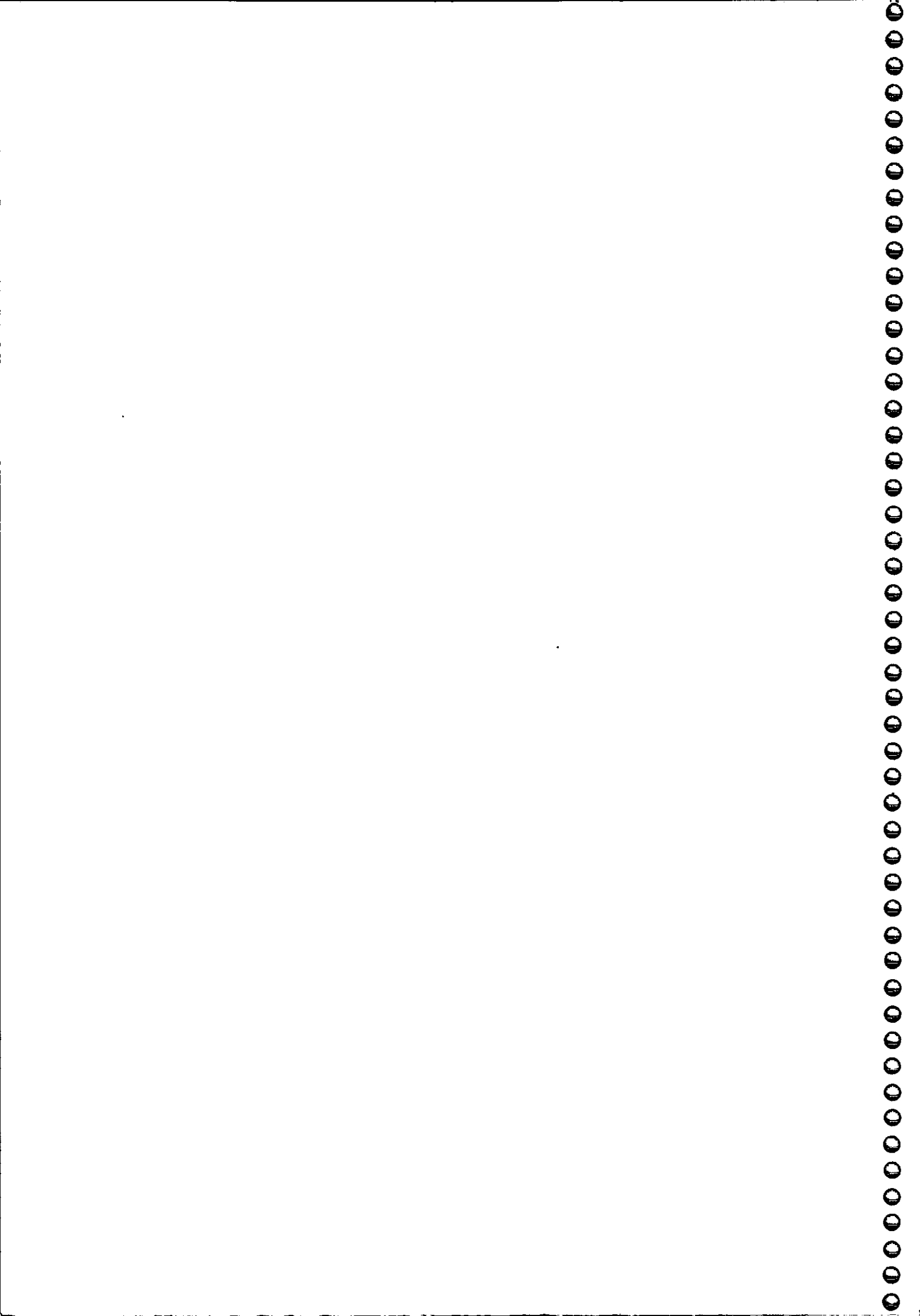
1. Introdução	15
2. Noções de microbiologia	19
2.1. Divisões do mundo vivo	19
2.2. Morfologia e citologia dos principais grupos de interesse em alimentos	20
2.2.1. Bactérias	20
2.2.2. Fungos filamentosos	21
2.2.3. Leveduras	21
2.3. Efeito do ambiente sobre o crescimento microbiano	22
2.3.1. Água disponível (atividade aquosa)	22
2.3.2. Temperatura	22
2.3.3. Tensão de oxigênio	23
2.3.4. pH	23
2.3.5. Nutrientes	24
2.3.6. Constituintes antimicrobianos	24
3. Principais gêneros de microrganismos de importância em microbiologia de alimentos	27
3.1. Bactérias	27
3.1.1. Gênero: <i>Pseudomonas</i>	27
3.1.2. Gênero: <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconobacter</i>	27
3.1.3. Gênero: <i>Halobacterium</i>	27
3.1.4. Gênero: <i>Alcaligenes</i>	27
3.1.5. Gêneros: <i>Acinetobacter</i> e <i>Moraxella</i>	28
3.1.6. Gêneros: <i>Escherichia</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Erwinia</i>	28
3.1.7. Gênero: <i>Vibrio</i>	28
3.1.8. Gênero: <i>Aeromonas</i>	29
3.1.9. Gênero: <i>Bacteroides</i>	29
3.1.10. Gênero: <i>Micrococcus</i>	29
3.1.11. Gênero: <i>Staphylococcus</i>	29
3.1.12. Gêneros: <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> (Família <i>Streptococcaceae</i>)	29
3.1.13. Gênero: <i>Sarcina</i>	30

3.1.14. Gêneros: <i>Bacillus</i> e <i>Clostridium</i> (Família Bacillaceae)	30
3.1.15. Gênero: <i>Lactobacillus</i>	32
3.1.16. Gênero: <i>Propionibacterium</i>	32
3.2. Fungos filamentosos	32
3.2.1. Classe: Zigomicetos	32
3.2.2. Classe: Ascomicetos	33
3.2.3. Classe: Basidiomicetos	33
3.2.4. Classe: Deuteromicetos	33
3.3. Leveduras	34
3.3.1. Classe: Ascomicetos	34
3.3.2. Classe: Deuteromicetos	35
4. Preparo de amostra para exame microbiológico	39
4.1. Colheita de amostra	39
4.2. Retirada da amostra	40
4.3. Preparo das diluições	40
4.3.1. Soluções diluentes	40
4.3.2. Soluções desinfetantes	41
5. Normas de trabalho no laboratório	45
6. Normas de higiene e ordem pessoais	49
7. Contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas (contagem padrão em placas)	53
7.1. Significado nos alimentos	53
7.2. Meio de cultura	53
7.2.1. Ágar padrão para contagem (PCA)	53
7.3. Metodologia e técnicas de análise	54
7.3.1. Técnica de análise	54
7.3.2. Resultado	54
8. Contagem de fungos filamentosos e leveduras	59
8.1. Fungos filamentosos (Bolors)	59
8.2. Leveduras (Fungos não-filamentosos)	59
8.3. Significado nos alimentos	60
8.4. Características fisiológicas	60
8.5. Meio de cultura	61
8.5.1. Ágar batata dextrose (BDA)	61

8.6. Metodologia e técnicas de análise	61
8.6.1. Técnica de análise	61
8.6.2. Resultado	61
9. Contagem de bactérias lácticas	65
9.1. Identificação	65
9.2. Significado nos alimentos	65
9.3. Meios de cultura	66
9.3.1. Ágar soro de laranja	66
9.3.2. Ágar seletivo para <i>Lactobacillus</i> (Meio Rogosa)	66
9.3.3. Ágar para <i>Lactobacillus</i> seg. DE Man, Rogosa e Sharpe (Ágar MRS)	67
9.4. Metodologia e técnicas de análise	68
9.4.1. Técnica de análise	68
9.4.2. Resultado	69
10. Enterobactérias	73
10.1. Identificação	73
10.2. Gênero I: <i>Escherichia</i> (Grupo Coliforme)	73
10.2.1. Técnica do número mais provável (NMP)	74
10.2.2. Técnica de contagem em placas	74
10.2.3. Meios de cultura	75
10.2.4. Metodologia e técnicas de análise	80
10.3. Gênero III: <i>Salmonella</i>	85
10.3.1. Características básicas	85
10.3.2. Hábitat natural	86
10.3.3. Alimentos propícios	86
10.3.4. Sintomatologia	86
10.3.5. Meios de cultura	86
10.3.6. Metodologia e técnicas de análise	97
10.4. Outras enterobactérias	100
10.4.1. Hábitat natural	101
10.5. Principais provas bioquímicas utilizadas para identificação de enterobactérias	101
10.5.1. Prova de utilização do citrato de Simmons	101
10.5.2. Prova de fenilalanina	102
10.5.3. Prova de hidrólise da gelatina	104

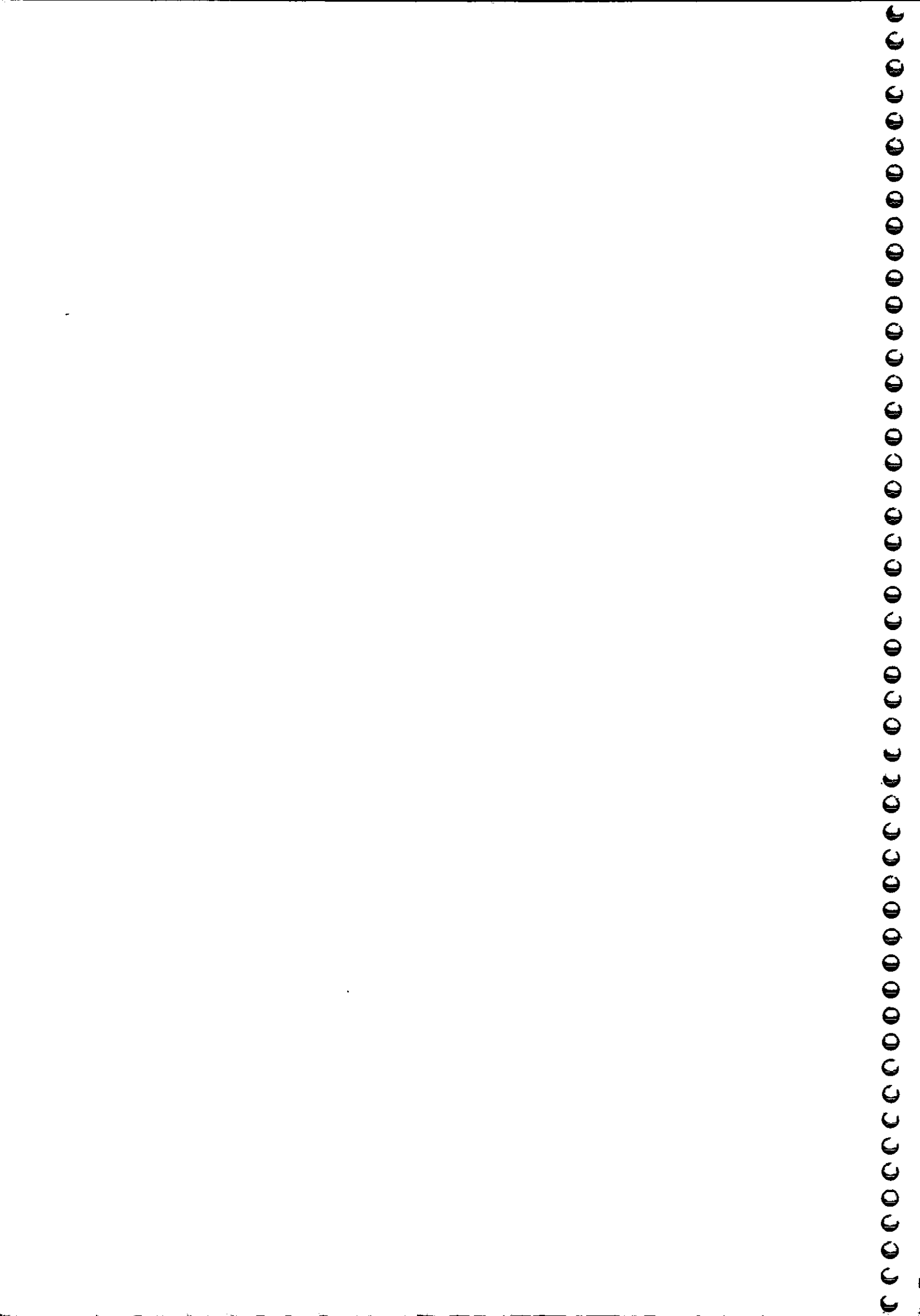
10.5.4. Prova de descarboxilação da lisina _____	105
10.5.5. Prova de fermentação de carboidratos e compostos correlatos _____	106
10.5.6. Prova de produção de indol _____	108
10.5.7. Prova de utilização do malonato _____	109
10.5.8. Prova de hidrólise da uréia _____	111
10.5.9. Prova do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) _____	112
10.5.10. Prova de H ₂ S, indol e motilidade _____	114
10.5.11. Prova de crescimento em KCN _____	116
11. <i>Staphylococcus aureus</i> _____	119
11.1. Identificação _____	119
11.2. Características básicas _____	119
11.3. Hábitat natural _____	119
11.4. Alimentos propícios _____	119
11.4.1. Significado nos alimentos _____	120
11.5. Intoxicação por <i>S. aureus</i> _____	120
11.5.1. Toxina _____	120
11.5.2. Sintomatologia _____	120
11.6. Meios de cultura _____	120
11.6.1. Ágar Baird-Parker _____	120
11.6.2. Ágar Vogel-Johnson _____	122
11.6.3. Ágar Chapman-meio para <i>Staphylococcus</i> número 110 _____	124
11.7. Provas bioquímicas _____	125
11.7.1. Meio de enriquecimento: caldo de infusão de cérebro e coração _____	125
11.7.2. Prova de DNAse termorresistente _____	126
11.7.3. Prova da coagulase-plasma de coelho _____	126
11.7.4. Prova de catalase _____	128
11.8. Metodologia e técnicas de análise _____	128
11.8.1. Técnica de análise _____	128
12. <i>Bacillus cereus</i> _____	133
12.1. Identificação _____	133
12.2. Características básicas _____	133
12.3. Hábitat natural _____	133
12.4. Alimentos propícios _____	133
12.4.1. Significado nos alimentos _____	134

12.5. Intoxicação por <i>B.cereus</i> _____	134
12.5.1. Toxina _____	134
12.5.2. Sintomatologia _____	134
12.6. Meios de cultura _____	134
12.6.1. Ágar base seletivo para <i>B.cereus</i> seg. Mossel _____	134
12.7. Provas bioquímicas _____	136
12.7.1. Prova de fermentação de carboidratos e compostos correlatos _____	136
12.7.2. Prova de redução do nitrato _____	136
12.7.3. Prova de hidrólise do amido _____	138
12.7.4. Prova de reações metabólicas _____	140
12.7.5. Prova do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) _____	141
12.7.6. Prova de hidrólise da gelatina _____	141
12.8. Metodologia e técnicas de análise _____	141
12.8.1. Técnica de análise _____	141
13. <i>Clostridium perfringens</i> _____	145
13.1. Identificação _____	145
13.2. Características básicas _____	145
13.3. Hábitat natural _____	145
13.4. Alimentos propícios _____	145
13.4.1. Significado nos alimentos _____	146
13.5. Intoxicação por <i>C.perfringens</i> _____	146
13.5.1. Toxina _____	146
13.5.2. Sintomatologia _____	146
13.6. Meios de cultura _____	146
13.6.1. Ágar seletivo para <i>C.perfringens</i> seg. Angelotti (Ágar SPS) _____	146
13.6.2. Ágar triptose sulfito cicloserina (base) _____	148
13.6.3. Meio de tioglicolato _____	149
13.7. Provas bioquímicas _____	150
13.7.1. Prova de redução do nitrato e de motilidade _____	150
13.7.2. Prova de fermentação da lactose e motilidade _____	151
13.7.3. Prova de coagulação do leite _____	152
13.8. Metodologia e técnicas de análise _____	153
13.8.1. Técnica de análise _____	153
14. Referências _____	159



“**N**ão há qualquer campo do saber humano, seja na indústria, na agricultura, no preparo de alimentos, em conexão com problemas de habitação ou de vestuário, na conservação da saúde humana ou de animais e no combate às doenças, em que o micróbio não desempenhe um papel importante e, às vezes, dominante”.

“Trecho do discurso presidencial à Sociedade de Bacteriologistas Norte-americanos (1942), proferido por Selman A. Waksman” (Pelczar 1980).



1. Introdução

A Microbiologia é um ramo da Biologia que tem por finalidade o estudo dos microrganismos e de suas atividades, com aplicabilidade em diversas áreas, tais como a médica, a ambiental, a industrial, a de solos e a de alimentos.

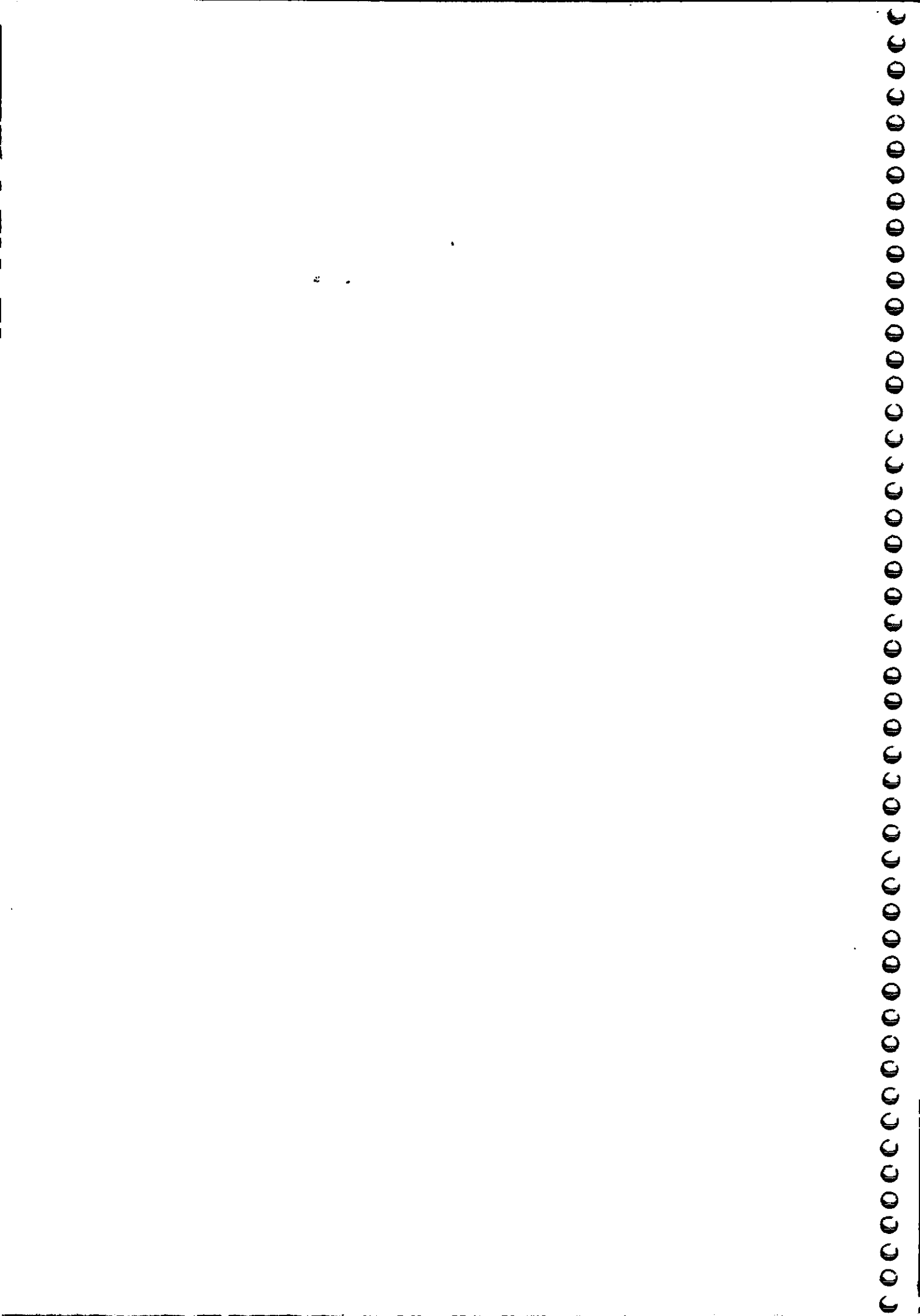
A Microbiologia de Alimentos se desenvolveu pela necessidade de conhecimentos sobre os microrganismos de importância para os produtos alimentícios, as interações que ocorrem entre esses microrganismos e os alimentos e as interações entre microrganismo-alimento-homem. Desta forma, hoje se conhece os grupos, espécies, e em muitos casos os biotipos, sorotipos e fagotipos de microrganismos de importância na produção e na deterioração de alimentos, e nos processos de toxinfecções alimentares. Também para este fim, foram adaptadas técnicas para detecção, enumeração e identificação desses microrganismos, bem como de metabólitos tóxicos.

Com relação a interação entre microrganismo e o alimento, o microbiologista procura estudar as fontes primárias das diferentes espécies; conhecer o comportamento de cada grupo ou espécie frente aos processos de conservação; conhecer as condições para que ocorram formação de toxinas, bem como estudar e desenvolver medidas de controle da proliferação nos alimentos.

Já na área de Saúde Pública, é necessário que o microbiologista conheça os níveis de microrganismos necessários, para que o alimento não se torne potencialmente perigoso; o período de incubação e os sintomas das toxinfecções alimentares, bem como as medidas de controle.

Graças ao desenvolvimento da microbiologia de alimentos, os produtos alimentícios industrializados podem ser produzidos com maiores garantias de qualidade microbiológica, evitando-se perdas por deteriorações e problemas de Saúde Pública, antes freqüentes pela falta de controles.

O objetivo deste manual de técnicas foi o de agrupar algumas informações básicas de microbiologia de alimentos, necessárias às indústrias que estão em fase de implantação de um controle microbiológico. Assim, inicialmente foi enfocada, de forma sucinta, noções teóricas básicas de microbiologia direcionada à área de alimentos e posteriormente, as principais metodologias de rotina empregadas no controle microbiológico de alimentos. Com as fotografias, pretendeu-se facilitar a execução e interpretação dos resultados aos técnicos de microbiologia não familiarizados com os meios de cultura e métodos utilizados para análise de alimentos.



2. Noções de microbiologia

A célula é a unidade fundamental dos seres vivos, sendo caracterizada pela origem, ou seja, uma célula surge somente pela divisão de uma célula preexistente ou, no caso de reprodução sexuada, pela fusão de duas células preexistentes.

Quanto aos tipos de organização celular, os seres vivos podem ser:

- a) **unicelulares:** é o tipo mais simples de organização, sendo a totalidade do organismo constituído de uma única célula.
- b) **multicelulares:** embora um organismo multicelular se origine de uma única célula, ele é constituído, no estado maduro, de muitas células, permanentemente unidas umas às outras de uma forma característica.
- c) **cenocíticos:** são organismos multinucleados.

Os organismos de interesse para Microbiologia de Alimentos são unicelulares ou multicelulares.

2.1. Divisões do mundo vivo

É senso comum que existem dois reinos de organismos bem distintos: o VEGETAL e o ANIMAL. Os microrganismos, por muito tempo foram incluídos nestes dois reinos. Entretanto, inúmeros casos duvidosos ocorriam quanto a classificação. O problema taxonômico foi resolvido quando HAECKEL estabeleceu um terceiro reino, o dos PROTISTAS, que abrange os protozoários, fungos, algas e bactérias (PELCZAR et al., 1980).

Porém, um outro sistema de classificação, de cinco reinos, segundo PELCZAR et al. (1980), foi proposto por Whittaker (1969) e aceito por que considera relações evolutivas e é compatível com estudos bioquímicos, genéticos e ultra-estruturais. Neste sistema os procariotes foram incluídos no reino Monera enquanto que os microrganismos eucarióticos unicelulares foram colocados no reino Protista. Os organismos eucarióticos multicelulares e multinucleados encontram-se nos reinos Plantae (plantas verdes multicelulares e algas superiores), Animalia (animais pluricelulares) e Fungi (fungos superiores multinucleados). Neste novo sistema, os microrganismos podem ser encontrados em três dos cinco reinos: reino Monera (bactérias e algas azul-verdes), reino Protista (microalgas e protozoários) e reino Fungi (fungos filamentosos e leveduras).

PELCZAR et al. (1980) cita que o Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, 8ª edição, que é utilizado como padrão de referência na taxonomia bacteriana, reconheceu o reino Monera de Whittaker, chamando-o, no entanto, de Procaryotae, em virtude da natureza procariótica das células. Este reino possui duas divisões: uma para as algas azul-verdes ou cianobactérias e outra para as bactérias ou "organismos procarióticos que não são algas azul-verdes.

2.2. Morfologia e citologia dos principais grupos de interesse em alimentos

Dentre os microrganismos existentes, as bactérias e os fungos têm interesse para a Microbiologia de Alimentos, por serem responsáveis por processos de deterioração, por participarem da elaboração de alimentos ou por serem responsáveis por toxinfecções de origem alimentar. As bactérias possuem células procarióticas, menos evoluídas (não têm, dentre outras características, membrana nuclear e mitocôndrias) e os fungos células eucarióticas, tais como os animais e vegetais superiores.

2.2.1. Bactérias

- a) **dimensões:** as bactérias possuem células que têm geralmente entre 1 a 10 micrômetros (μm) de comprimento ou de diâmetro. Normalmente o aumento de 400 vezes é empregado para observação a fresco e de 1000 vezes para lâminas coradas.
- b) **formas:** as bactérias podem ser encontradas sob forma de cocos, bastonetes e de espirais (rígidos, flexíveis ou incompletos).
- c) **componentes celulares:**
 - **cápsula:** é uma estrutura roxa, semelhante a um gel, que varia grandemente entre os microrganismos quanto a espessura, densidade e aderência à parede celular. Estão presentes em algumas bactérias, não sendo entretanto uma estrutura obrigatória.
 - **parede celular:** a parede celular tem como funções, conferir rigidez a célula, protegendo-a contra injúrias mecânicas e a ruptura osmótica e dar uma permeabilidade seletiva à célula. É constituída de uma camada basal de glicopeptídeo, recoberta por camadas adicionais. A parede celular permite a divisão das bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas e Gram negativas. A permeabilidade da mesma, após o tratamento com etanol, define o tipo da coloração.
 - **membrana celular:** é constituída de lipídeos (cerca de 40%), proteínas (cerca de 60%) e alguns carboidratos. Serve como barreira osmótica, impermeável às substâncias ionizadas, e possui sistema de transportes de nutrientes.
 - **citoplasma:** no caso das bactérias, o citoplasma contém organelas e inclusões típicas de uma célula procariótica, tais como a região nuclear, ribossomas e poliribossomas, mesossomas e granulações.
 - **esporo:** é uma estrutura de resistência das bactérias, sendo formado geralmente quando as condições são adversas às células vegetativas. Apresenta alta resistência ao calor, radiações, penetração de corantes e desinfetantes. Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* possuem espécies esporuladas de importância em microbiologia de alimentos.
 - **flagelos:** quando presentes, são responsáveis pela motilidade das bactérias.

- d) **reprodução:** as células bacterianas, na reprodução assexuada, se dividem por bipartição ou cissiparidade.

2.2.2. Fungos filamentosos

São também conhecidos como bolores ou mofos.

a) **principais estruturas:**

- **talo:** é a menor porção de fungo capaz de exercer todas as atividades vitais.
- **hifas:** são filamentos do fungo que se originam pelo desenvolvimento de um talo. A hifa pode se ramificar repetidamente e se alongar, formando um sistema ramificado de hifas que constitui o micélio.
- **micélio:** o micélio é um agregado de hifas e representa a parte visível do fungo, vista frequentemente em materiais embolorados. Possui coloração normalmente branca, podendo apresentar-se rosado ou amarelado. O aspecto é geralmente algodonoso ou aveludado.
- **rizóides e estolons:** os rizoídes são estruturas semelhantes a raízes, que servem para a fixação do fungo. Existem no gênero *Rhizopus*, no qual uma outra estrutura é encontrada, o estolon, responsável por uma das formas de propagação dos bolores desse gênero.
- **clamidosporos, esclerócios e microesclerócios:** são estruturas de resistência dos fungos filamentosos. São emaranhados de hifas, com grande capacidade da sobrevivência, e que resistem a condições adversas.

b) **citologia:**

- **parede celular:** a composição varia com a espécie estando celulose, quitina ou ambas presentes.
- **membrana celular:** semelhante a das bactérias.
- **citoplasma:** é típico de uma célula eucariótica. As inclusões mais frequentes são glicogênio, gorduras, cristais de oxalato e citrato.

2.2.3. Leveduras

São fungos unicelulares, conhecidos também por fermentos.

- a) **tamanho:** varia de 2 a 20 μm podendo, entretanto, chegar a 100 μm de comprimento. A largura varia geralmente de 1 a 9 μm .
- b) **formas:** podem ser redondas, ovais, apiculadas, elípticas e triangulares.
- c) **estruturas de reprodução vegetativa:**
- **broto ou gema:** origina-se de uma célula mãe, e este tipo de reprodução é uma característica das leveduras, com exceção das espécies do gênero *Schizosaccharomyces*, que se reproduzem por fissão binária.

- **pseudomicélio:** é semelhante ao micélio dos fungos filamentosos. Ocorrem quando há sucessivas gemulações e as células filhas não se desprendem das células mães.
 - **esporos:** os diferentes tipos são:
 - * **Artrosporos:** ocorre fissão binária, sendo o micélio verdadeiro.
 - * **Blastosporos:** originário de gemulações laterais de pseudomicélios avançados.
 - * **Clamidosporos:** se formam em condições desfavoráveis, o ponto de conexão das hifas.
 - * **Balistosporos:** formados nos basidiomicetos dos gêneros *Sporobolomyces* e *Bullera*. São lançados por um mecanismo especial.
- d) **citologia:** células tipicamente eucarióticas. Podem apresentar cápsula como as bactérias. A parede celular é muito rígida, contendo glucanas, manana, lipídeos e fosfatos.

2.3. Efeito do ambiente sobre o crescimento microbiano

O ambiente influencia significativamente o crescimento dos microrganismos, sendo os seguintes os fatores que mais o afetam.

2.3.1. Água disponível (atividade aquosa)

A água é essencial para o metabolismo. Entretanto, não basta que esteja apenas presente, mas que esteja de forma disponível. As concentrações de solutos podem impedir que os microrganismos utilizem a água, como por exemplo de uma solução rica em açúcar ou em cloreto de sódio.

Microrganismos **osmofílicos** são capazes de se multiplicarem em altas concentrações de açúcar e **osmodúricos**, são capazes de suportar altas concentrações (mas não de se multiplicarem). Já os **halofílicos** e **halodúricos** são capazes de se multiplicar ou de suportar altas concentrações de NaCl, respectivamente.

De um modo geral, as bactérias necessitam de mais água livre do que as leveduras, e estas mais do que os fungos filamentosos.

2.3.2. Temperatura

Os microrganismos são capazes de serem encontrados em ampla faixa de temperatura (de -20°C a $+90^{\circ}\text{C}$) devido a grande capacidade de adaptação que possuem.

Todo microrganismo tem uma **temperatura ótima** de crescimento e uma **faixa de crescimento**. Na temperatura ótima, o tempo de geração é o menor possível, havendo uma rápida multiplicação. Quanto mais a temperatura se afasta do ótimo,

porém dentro da faixa de crescimento, maior é o tempo de geração, ficando portanto mais lenta a multiplicação. Em temperaturas abaixo da faixa de crescimento, não há multiplicação. Já em temperaturas superiores, pode haver redução, caso a temperatura seja letal à célula.

De acordo com as preferências de temperaturas para crescimento os microrganismos podem ser divididos em:

- a) **mesófilos:** quando se multiplicam bem entre 20 e 45°C, tendo o ótimo de temperatura entre 30 e 45°C.
- b) **termófilos:** quando se multiplicam acima de 45°C, tendo um ótimo entre 45 e 55°C. Os termodúricos não se multiplicam, porém suportam temperaturas elevadas.
- c) **psicrotróficos:** quando se multiplicam em temperaturas de refrigeração, tendo o ótimo para crescimento entre 20 e 30°C.
- d) **psicrófilos:** quando se multiplicam em temperaturas de refrigeração, com temperatura ótima entre 12 e 15°C.

2.3.3. Tensão de oxigênio

Com relação a tensão de oxigênio necessária ao desenvolvimento, os microrganismos podem ser classificados em:

- a) **aeróbios:** quando só desenvolvem na presença de oxigênio (ar atmosférico).
- b) **anaeróbios:** quando só se desenvolvem na ausência do oxigênio.
- c) **facultativos:** quando se desenvolvem tanto na presença como na ausência do oxigênio.
- d) **microaerófilos:** necessitam de pequenas quantidades de oxigênio.

2.3.4. pH

É um fator de grande importância na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver no alimento. Em função deste parâmetro, os alimentos podem ser classificados em:

- a) **alimentos pouco ácidos:** os que possuem pH superior a 4,5. Ex: leite, carnes, pescados, alguns vegetais etc.
- b) **alimentos ácidos:** os que possuem pH entre 4,5 a 4,0.
Ex: algumas frutas e hortaliças.
- c) **alimentos muito ácidos:** os que possuem pH inferior a 4,0. Ex: frutas cítricas, refrigerantes, maçãs, azeitonas, etc.

O pH 4,5 é muito importante em microbiologia de alimentos, pois assinala o nível abaixo do qual não há desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, bem como, de modo geral, das bactérias patogênicas.

A microflora de alimentos pouco ácidos ($\text{pH} > 4,5$) é muito variada, havendo condições para o desenvolvimento da maioria das bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Em alimentos ácidos (pH entre 4,5 e 4,0), as bactérias que podem se desenvolver são as lácticas e algumas esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Nesta faixa os fungos filamentosos e as leveduras encontram boas condições para seu desenvolvimento. Finalmente, nos alimentos muito ácidos ($\text{pH} < 4,0$) podem se desenvolver apenas os fungos filamentosos e leveduras e por vezes bactérias lácticas e acéticas.

2.3.5. Nutrientes

Os microrganismos variam quanto suas exigências aos fatores de crescimento e a capacidade de utilizarem diferentes substratos que compõem os alimentos.

a) **fonte de carbono:** pode muitas vezes limitar o crescimento dos microrganismos. Os carboidratos complexos (polissacarídeos), tais como amido e celulose são diretamente utilizados por um número restrito de microrganismos. Os fungos filamentosos são de particular interesse na deterioração de alimentos que contenham esses substratos, por haver muitas espécies produtoras de enzimas celulolíticas e amilolíticas.

As gorduras e os óleos são atacados por microrganismos lipolíticos como por exemplo, muitos fungos filamentosos, leveduras e bactérias (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* e outros), porém grande número de microrganismos não tem capacidade de crescerem nestes substratos. Microrganismos com atividade pectinolítica provocam a quebra da pectina dos vegetais.

b) **fonte de nitrogênio:** não é tão importante quanto a de carbono na limitação do desenvolvimento. Microrganismos proteolíticos são importantes em alimentos ricos em proteínas, onde provocam alterações no sabor e no odor.

c) **fonte de vitaminas:** em geral os alimentos possuem as quantidades necessárias para o crescimento dos microrganismos. As bactérias Gram positivas são as mais exigentes de vitaminas do Complexo B, sendo que as Gram negativas e os fungos geralmente são capazes de sintetizar todas as vitaminas que necessitam.

d) **sais minerais:** não são limitantes ao desenvolvimento microbiano.

2.3.6. Constituintes antimicrobianos

A estabilidade de alguns produtos, de origem animal e vegetal, ocorre na natureza devido a presença de substâncias antimicrobianas. Alguns exemplos são as amoras, que possuem o ácido benzóico; cravos, que tem óleos essenciais e a canela, que contém aldeído cinâmico.

3. Principais gêneros de microrganismos de importância em microbiologia de alimentos

Os microrganismos de interesse em microbiologia de alimentos encontram-se em três grandes grupos: bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

3.1. Bactérias

3.1.1. Gênero: *Pseudomonas*

São bastonetes Gram negativos, aeróbios, móveis. Muitas espécies são psicrófilas e dotadas de atividade lipolítica e proteolítica. Algumas espécies produzem pigmentos fluorescentes. Vivem especialmente no solo e na água (salgada ou doce).

As *Pseudomonas*, de um modo geral, são importantes na deterioração de pescado, carnes e derivados, aves, leite e derivados, provocando problemas, tais como limosidade superficial e odores desagradáveis devido a atividade proteolítica e lipolítica.

3.1.2. Gênero: *Acetobacter* e *Gluconobacter*

Espécies destes gêneros compõem o grupo das bactérias acéticas, pois produzem ácido acético a partir do etanol. São bastonetes, Gram negativos, aeróbios.

São importantes na produção de vinagres, estando também implicadas na deterioração de bebidas e vinagres, formando películas ou turvações nos mesmos. *Acetobacter aceti* é uma espécie bastante usada na produção de vinagres.

3.1.3. Gênero: *Halobacterium*

São bastonetes, Gram negativos, aeróbios. Vivem em ambientes, que contém alta concentração de cloreto de sódio (sendo, portanto, halofílicos), tais como salinas, lagos salgados, materiais salgados (ex: charque).

São responsáveis pelo chamado "vermelhão do charque", pois suas células possuem pigmentos vermelhos (do tipo carotenóides). As espécies mais importantes são *H.halobium* e *H.salinarium*.

3.1.4. Gênero: *Alcaligenes*

São também bastonetes Gram negativos, aeróbios. São psicrotróficos e pouco proteolíticos.

Vivem no trato intestinal do homem e animais, águas frescas e produtos de laticínios. São importantes na deterioração do leite, aves e outros alimentos.

3.1.5. Gênero: *Acinetobacter* e *Moraxella*

São bastonetes, Gram negativos, aeróbios, que vivem principalmente no solo e na água. Podem provocar problemas de deterioração de alimentos conservados pelo frio, especialmente carnes e pescado não processados, dos quais são importantes deterioradores.

3.1.6. Gêneros: *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia*

Constituem a família *Enterobacteriaceae*, que se caracteriza por possuir como representantes, bactérias em bastonete, Gram negativas, facultativas, móveis ou imóveis, e que reduzem NO_3 a NO_2 .

Vivem no trato intestinal do homem e de animais, mas certas espécies podem ser encontradas vivendo saprofiticamente em plantas, ou mesmo sendo patógenos de vegetais. De importância, destacam-se nessa família:

- a) como indicadores de contaminação fecal: o Grupo Coliforme: são enterobactérias que fermentam a lactose com produção de gás e ácido em 24-48h a 35°C. Compreende os gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Este grupo é utilizado como indicador de condições higiênicas dos alimentos.

Já o grupo dos coliformes fecais (constituído principalmente por *Escherichia coli*) são bons indicadores de contaminação fecal recente, e conseqüentemente da possibilidade da presença de patogênicos, transmitidos pelas fezes, nos alimentos.

- b) como patogênicos: espécies dos gêneros *Salmonella* e *Shigella*, bem como as espécies *Escherichia coli* (certas estirpes) e *Yersinia enterocolitica*, são importantes como causadoras de infecções alimentares.
- c) como deteriorantes: espécies do gênero *Proteus*, como por exemplo o *P.vulgaris*, são importantes na deterioração de produtos de origem animal (carnes, pescado, aves e ovos, principalmente) refrigerados. O gênero *Serratia* está envolvido em deteriorações de pães, carnes, ovos e pescado. Já o gênero *Erwinia* é de particular importância na deterioração de vegetais (frutas e hortaliças). Representantes do grupo coliforme podem ser responsáveis pela produção de gases em queijos e em vegetais fermentados (azeitonas, por exemplo).

3.1.7. Gênero: *Vibrio*

As espécies desse gênero são bastonetes curvos (vibriões), Gram negativos, com flagelo polar único. São facultativos, necessitando geralmente de 3% de NaCl para seu desenvolvimento.

Vivem em águas (salgadas ou doces). As espécies de importância são *V.cholerae*, agente da cólera e *V.parahaemolyticus*, causador de infecção alimentar. Alimentos de origem marinha são importantes veículos de *V.parahaemolyticus*.

3.1.8. Gênero: *Aeromonas*

Compreende bastonetes, Gram negativos, facultativos, com muitas espécies psicrotróficas. São importantes na deterioração de carnes, pescado e ovos.

3.1.9. Gênero: *Bacteroides*

Compreende espécies anaeróbias, Gram negativas, muitas vezes envolvidas na deterioração de carnes, nas quais chegam através de contaminação fecal.

3.1.10. Gênero: *Micrococcus*

As espécies deste gênero são cocos, Gram negativos e produzem colônias pigmentadas (rosa, laranja) ou não. São amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados na pele do homem, pêlos de animais, sujidades, solo, água e em muitos alimentos.

Algumas espécies são psicrotróficas e estão associadas a deteriorações de produtos de laticínios e de carnes processadas.

3.1.11. Gênero: *Staphylococcus*

São cocos, Gram positivos. Em lâmina, formam às vezes grupamentos semelhantes a cachos de uva. A maioria das estirpes de *Staphylococcus aureus* produzem pigmento dourado e coagula o plasma sanguíneo do coelho (são coagulase +).

Já *Staphylococcus epidermidis* não é pigmentado e não produz coagulase. Ambos são comuns na cavidade nasal do homem e de certos animais, bem como na garganta, onde pode provocar infecções. Podem também ser encontrados na pele. Infecções e furúnculos são focos importantes de *S.aureus*. Essa espécie é importante por provocar intoxicação alimentar.

3.1.12. Gêneros: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* (Família *Streptococcaceae*)

Juntamente com o gênero *Lactobacillus*, constituem as bactérias lácticas. Possuem células esféricas ou ovóides, não móveis, Gram positivos, sendo anaeróbios facultativos.

O hábitat desses microrganismos é variado, e podem ser encontrados na mucosa bucal, trato intestinal, leite, derivados, superfície de vegetais e outros locais. Esta família é importante para:

- a) laticínios: espécies de *Streptococcus* e/ou *Leuconostoc* são utilizados na produção de leites fermentados, queijos e manteigas.
- b) produção de vegetais fermentados: tais como picles, azeitonas e chucrutes.
- c) indicação de contaminação fecal: a contagem de estreptococos fecais é utilizada para indicar a contaminação de água e alimentos por material fecal. Por serem mais resistentes às condições adversas do que os coliformes, são empregados em padrões para produtos processados, especialmente os congelados. Os streptococos fecais compreendem as seguintes espécies, pertencentes ao Grupo D de Lancefield: *S.faecalis*, *S.faecium*, *S.bovis* e *S.equinus*.
- d) deterioração de alimentos e bebidas: tais como cervejas e vinhos e (especialmente espécies de *Pediococcus*); carnes e derivados (provocam acidificação, esverdeamento e viscosidade); leite (azedamento); sucos de frutas (odor de manteiga, azedamento).

3.1.13. Gênero: *Sarcina*

Compreende espécies em cocos, Gram positivos, imóveis. São facultativos e produzem pigmento amarelo. Crescem em ampla faixa de pH e têm crescimento mesófilo. São importantes na deterioração de alimentos mantidos a temperatura elevada.

3.1.14. Gêneros: *Bacillus* e *Clostridium* (Família *Bacillaceae*)

São bastante importantes por terem espécies esporuladas.

3.1.14.1. Gênero: *Bacillus*

Compreende bastonetes Gram positivos, móveis na maioria, esporulados. São estritamente aeróbios ou facultativos.

Produzem somente ácido quando crescem em anaerobiose, com exceção das espécies *B.polymyxa* e *B.macerans*, que também produzem gás ($H_2 + CO_2$). São mesófilos, na maioria, havendo espécies termófilas.

São amplamente difundidos no solo, água, ar, podendo os esporos sobreviverem por períodos bastante longos sob condições adversas. Este gênero é importante, em alimentos por causar:

- a) toxinfecção alimentar: certas estirpes de *B.cereus* são importantes por provocarem problemas de toxinfecções alimentares. São vinculados principalmente em cereais e produtos de cereais.
- b) deterioração de enlatados: podem provocar problemas, principalmente as espécies:
 - *B.stearothermophilus*: são os "flat-sour" dos produtos pouco ácidos (pH > 4,5), produzindo ácido sem despreendimento de gás. A lata fica com aspecto normal, mas há turvação e aumento da acidez. É uma espécie termófila.

- *B.coagulans*: é também “flat-sour”, só que de alimentos ácidos (pH entre 4,0 e 4,5), principalmente produtos de tomate. Seus esporos são moderadamente resistentes ao calor úmido.
- *B.polymyxa* e *B.macerans*: são pectinolíticos, se desenvolvem a pH de 4,0 a 7,5, sendo resistentes ao calor seco. São importantes em alimentos embalados assepticamente (latas esterilizadas sob calor seco, separadamente).

c) deterioração de alimentos em geral: somente no caso de perecíveis, mantidos em temperatura elevada.

3.1.14.2. Gênero: *Clostridium*

As espécies deste gênero são bactérias em bastonetes, Gram positivos, móveis, anaeróbios obrigatórios, com algumas espécies capazes de crescimento microaerófilo. Algumas espécies tem atividade sacarolítica, outras atividades proteolítica e outras com os dois tipos de atividade simultaneamente. O pH ideal para a maioria das espécies está entre 6,0 e 7,0. O pH 4,6 é crítico para *C.botulinum*. Abaixo deste pH ele não se desenvolve. Algumas espécies (*C.pasteurianum* e *C.butyricum*) conseguem se desenvolver em pH baixo (cerca de 4,0). A maioria das espécies são mesófilas, havendo algumas termófilas. São amplamente distribuídos na natureza, principalmente no solo, água e poeira. Este gênero tem sua importância, em alimentos, por causar:

- a) toxinfecção alimentar: *C.botulinum* e *C.perfringens* são espécies capazes de provocar toxinfecções. *C.botulinum* causa o botulismo, intoxicação bastante séria, sendo a mortalidade cerca de 40%. Os alimentos enlatados são os mais envolvidos em surtos, principalmente as conservas caseiras. *C.perfringens* tipo A, causa toxinfecção não tão perigosa, sendo os produtos cárneos, sopas e carnes preparadas os principais alimentos envolvidos.
- b) deterioração de enlatados: espécies de *Clostridium* estão muito envolvidas, por serem esporuladas, em deterioração de alimentos enlatados. Algumas das mais frequentes são:
 - *C.sporogenes*: os esporos são bastante resistentes. É termófilo e está freqüentemente envolvido na deterioração de pescados enlatados. É bastante proteolítico.
 - *Desulfotomaculum nigrificans*: antes denominado *C.nigrificans* é levemente proteolítico, produz H₂S (escurecendo o produto pela formação de FeS) e é termofílico. Causa problemas geralmente no milho e ervilha.
 - *C.pasteurianum* e *C.butyricum*: são importantes em produtos ácidos (pH 4,0-4,6). São sacarolíticos, causando problemas geralmente em pastas, purês e néctares de frutas.
 - *C.thermosaccharolyticum*: uma espécie termófila, com esporos bastante resistentes ao calor. Se desenvolvem em pH de 3,7 a 7,5.

3.1.15. Gênero: *Lactobacillus*

São microrganismos em bastonetes, Gram positivos, podendo ser móveis ou imóveis. Possuem metabolismo fermentativo, podendo ser homo ou heterolático.

Podem apresentar crescimento de 5 a 53°C, sendo muitas espécies termodúricas. Podem se desenvolver em pH 5,5 - 5,8 ou menor. Produzem ácido lático predominantemente, sendo maior que 85% dos produtos de fermentação no caso das homoláticas e menor que 85% no caso das heteroláticas. Estas últimas, produzem também CO₂, etanol e ácido lático. O hábitat é muito variado, podendo ser a cavidade oral, produtos de laticínio, água, vegetais, etc.

Importância:

- a) produção de leites fermentados e queijos: *L.bulgaricus*.
- b) produção de ácido lático: *L.delbruechii*
- c) produção de vegetais fermentados: *L.plantarum*, *L.fermentum*
- d) deterioração de alimentos e bebidas: o leite, carnes, vinhos e cervejas.

3.1.16. Gênero: *Propionibacterium*

São bactérias semelhantes as bactérias lácticas. Fazem entretanto a fermentação propiônica, com produção de ácido propiônico, ácido acético e CO₂. A espécie *P.shermanii* é importante na elaboração do queijo suíço.

3.2. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos estão distribuídos em 4 classes: Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Os gêneros de importância para alimentos são:

3.2.1. Classe: Zigomicetos

Três gêneros são de importância: *Mucor*, *Rhizopus* e *Thamnidium*. Estão envolvidos em deteriorações de vegetais (legumes e frutas); pães (principalmente *R.nigricans*); carnes refrigeradas e congeladas (*Thamnidium*).

Algumas espécies de *Mucor* são usadas na produção de enzimas, *M.rouxii* é utilizado para o preparo do "Tempeh", comida oriental.

3.2.2. Classe: Ascomicetos

3.2.2.1. Gênero: *Byssochlamys*

Possui ascósporos resistentes a altas temperaturas e também tolera baixa tensão de oxigênio, o que é incomum entre os fungos filamentosos. Devido a estas características são importantes na deterioração de frutas enlatadas e néctares.

3.2.3. Classe: Basidiomicetos

Não apresentam espécies de importância em microbiologia de alimentos. Apenas deve-se ressaltar que, nesta classe, estão localizados os cogumelos comestíveis.

3.2.4. Classe: Deuteromicetos

3.2.4.1. Gêneros: *Aspergillus* e *Penicillium*

Geralmente apresentam conídias de cores verde, verde-azuladas ou negras. São de importância na:

- a) maturação de queijos: *Proqueforti* (queijo roqueforte); *P.camemberti* (queijo camemberte).
- b) deterioração de alimentos: tais como cereais e derivados; produtos açucarados; produtos desidratados mal acondicionados ou armazenados; frutas, onde provocam podridões como a verde (*P.digitatum*) e a verde-azulada das frutas cítricas (*P.italicum*) e a decomposição negra (*A.niger*); alimentos preparados refrigerados; carnes e derivados; produtos de laticínio (queijos, principalmente).
- c) intoxicação alimentar: micotoxinas são produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* tais como: *A.flavus* (produz aflatoxina); *A.patulum* (produz patulina).

3.2.4.2. Outros gêneros

- a) Gênero: *Alternaria* - envolvido na deterioração de vegetais.
- b) Gênero: *Botrytis* - envolvido em deterioração de vegetais principalmente de frutas.
- c) Gênero: *Cladosporium* - causam problemas em carnes, provocando manchas negra.

- d) Gênero: *Geotrichum* - provoca deterioração de produtos de laticínio, sendo usado também como indicador de condições higiênicas de laticínios. Desenvolvem-se em baixas temperaturas.
- e) Gênero: *Sporotrichum* - é psicrotrófico e provoca manchas brancas em carnes.

3.3. Leveduras

Também estão distribuídas nas classes vistas para os fungos filamentosos uma vez que também são fungos.

3.3.1. Classe: Ascomicetos

3.3.1.1. Gênero: *Saccharomyces*

Apresentam células ovais ou redondas, produzem de 1 a 4 ascósporos por asco (célula). São fermentativos.

Importância:

- a) produção de etanol e bebidas: *S.cerevisiae* e *S.uvarum*.
- b) fermento de panificação: *S.cerevisiae*.
- c) deterioração de alimentos:
 - espécies osmofílicas: *S.bailii* e *S.rouxii*
 - deterioração de vegetais fermentados.
 - deterioração de sucos e refrigerantes.

3.3.1.2. Gênero: *Kluyveromyces*

Semelhante ao *Saccharomyces* tanto na morfologia quanto na fisiologia. Diferem do *Saccharomyces* por liberar os ascósporos após sua formação.

São importantes na deterioração de leite e derivados e na produção de proteína microbiana a partir do soro de leite.

3.3.1.3. Gêneros: *Pichia* e *Hansenula*

Possuem células arredondadas e ascósporos em forma de chapéu ou de saturno. Formam película ascendente quando crescem em meio líquido. Podem ser oxidativas ou fermentativas. Oxidam ácidos orgânicos a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, podendo elevar o pH do meio em que se desenvolvem.

Espécies de *Hansenula* podem tolerar altas concentrações de cloreto de sódio.

Importância:

- a) deterioração em vegetais fermentados: *P.membranaefaciens*, *H.anomala*
- b) deterioração de frutas.

3.3.1.4. Gênero: *Debaryomyces*

Formam película (mas não ascendente). Toleram altas concentrações de sal. São importantes na deterioração de salsichas (produção de limosidade ou "slime"), e crescem em salmouras de queijos.

3.3.1.5. Gênero: *Zygosaccharomyces*

São osmofílicos. São importantes na deterioração de mel, melaços, doces, sucos concentrados e produtos açucarados em geral.

3.3.1.6. Gênero: *Schizosaccharomyces*

São importantes na produção de bebidas (rum, principalmente), sendo responsável também pela deterioração de produtos açucarados. Algumas espécies são osmofílicas.

3.3.2. Classe: Deuteromicetos

3.3.2.1. Gênero: *Rhodotorula*

As espécies desse gênero não são fermentativas. Têm pigmentos tipo carotenóide, o que lhes confere coloração do laranja ao vermelho intenso.

Causam problemas em carnes, aves, produtos de laticínios e vegetais fermentados.

3.3.2.2. Gênero: *Kloeckera*

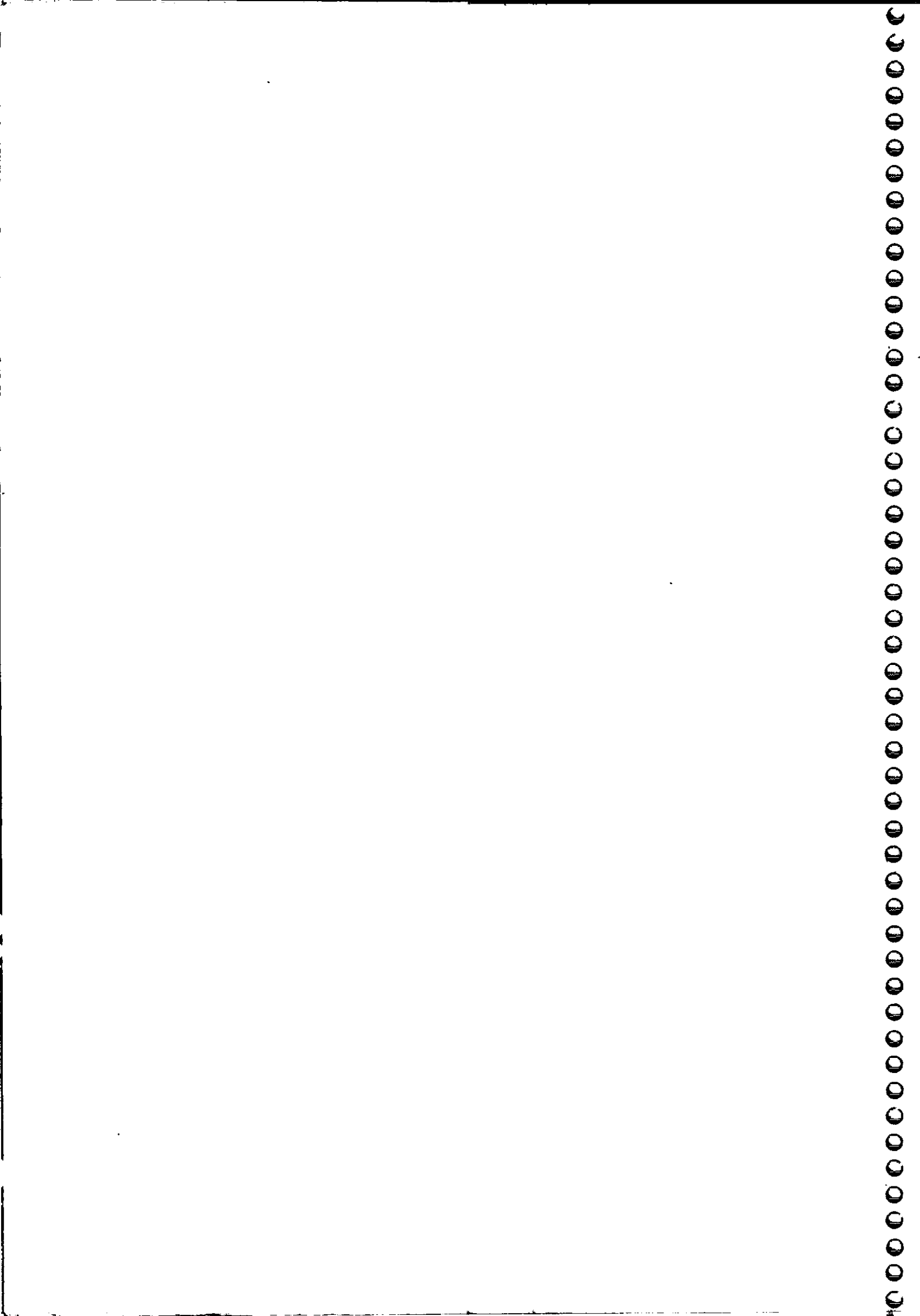
São leveduras apiculadas, encontradas principalmente no início da fermentação de líquidos açucarados, tais como o caldo de cana e sucos de frutas. Fermentam com rapidez.

3.3.2.3. Gênero: *Candida*

Compreende espécies que são importante na deterioração de alimentos, tais como gorduras, manteigas e margarinas (*C.lipolytica*), azeitonas (*C.mycoderma*) e outros. São oxidativas ou facultativas. *C.utilis* é muito utilizada como levedura alimentar (levedura Torula).

3.3.2.4. Gêneros: *Torulopsis*, *Trichosporum* e *Cryptococcus*

São espécies que também podem estar envolvidas na deterioração de alimentos.



4. Preparo de amostra para exame microbiológico

4.1. Colheita de amostra

Cuidados especiais devem ser tomados na colheita de amostra para análise microbiológica de alimentos, a observância de certas normas técnicas. Desta primeira fase da análise, depende, em muito, a validade de interpretação dos resultados laboratoriais. Dentre estas normas técnicas pode-se citar:

- a) planejamento para um perfeito sincronismo entre a colheita/remessa e a capacidade do laboratório executar as análises;
- b) colheita das amostras, sempre que for possível, em suas embalagens originais, e em quantidade nunca inferior a 100g ou 100 ml;
- c) na impossibilidade de atender o item anterior, a colheita da amostra deve ser feita em condições assépticas;
- d) deve-se proceder a limpeza e a desinfecção da embalagem do alimento a ser analisado, com solução de álcool iodado ou outro desinfetante, abrangendo uma área que alcance a pelo menos 10 cm da extremidade da abertura. No caso de embalagem com tampa destacável, deve-se proceder da mesma forma acima, com a tampa bem como com a área contígua até pelo menos 10 cm da borda da tampa. Quando tratar-se de recipiente hermeticamente fechado, outros cuidados devem ser tomados. A borda não codificada do recipiente deve ficar posicionada para cima, na qual faz-se a assepsia (limpeza e desinfecção). Usando-se um abridor de lata especial do tipo Bacti-Disc-Cutter, previamente esterilizado. Faz-se um orifício no centro, em forma de meia lua;
- e) acondicionamento da amostra, quando retirada da embalagem original, deve ser feito em recipiente íntegro, previamente esterilizado e identificado, capaz de resguardar de qualquer alteração, utilizando fechamento que não possa ser violado sem que se torne evidente;
- f) sempre que possível e/ou necessário, a amostra deve estar acompanhada de um relatório consignando local, hora e método da colheita, lote/partida e número que as constitui bem como um breve histórico ou informações que possam orientar a execução das análises e/ou a interpretação dos resultados;
- g) providências especiais deverão ser tomadas para que o tempo decorrido entre a colheita da amostra e a execução das análises seja o menor possível;
- h) as amostras devem ser mantidas em condições que impeçam o desenvolvimento de microrganismos, sem contudo impedir que estes continuem viáveis até o momento da análise. Assim, os alimentos deterioráveis devem ser mantidos sob refrigeração e os de baixa atividade aquosa (desidratados) em lugar seco e fresco.

4.2. Retirada da amostra

Todo o material a ser utilizado para a retirada da amostra deverá estar estéril, seja por calor seco (estufa a 180°C/2 horas), seja por calor úmido (autoclave a 121°C/15 min.) ou por flambagem.

Toda a operação de retirada de amostra deve ser efetuada, preferencialmente, dentro de uma capela de fluxo laminar, ou próximo de um bico de Bunsen com a chama a meia altura.

As embalagens devem ser desinfetadas antes de sua abertura que deverá ocorrer de maneira asséptica. Amostras de alimentos líquidos devem ser retirados com pipeta estéril, e os alimentos sólidos ou semi-sólidos devem ser pesados assepticamente.

4.3. Preparo das diluições

No preparo das diluições sucessivas podem ser utilizados diversos diluentes, tais como: as soluções de salina-peptonada, ou de citrato de sódio, ou de salina a 0,85%, ou água estéril, e outros. Para obtenção da diluição inicial (1/10) procede-se do seguinte modo:

- a) retirar assepticamente porções de 25 g ou 25 ml da amostra, colocando-se em homogeneizadores esterilizados;
- b) adicionar 225 ml do diluente, escolhido;
- c) homogeneizar por alguns minutos em velocidade reduzida, para não danificar as células microbianas que possam existir.

Esta diluição corresponde a uma proporcionalidade de 1:10, ou seja, 10 g do homogeneizado contém 1 g de amostra.

A partir da diluição inicial, a diluição 1:100 é feita retirando-se 10 ml da diluição inicial para 90 ml do diluente ou 11 ml para 99 ml, observando-se sempre o uso do mesmo diluente.

No preparo das demais diluições, proceder conforme descrito acima (Fig.1).

4.3.1. Soluções diluentes

a) Solução salina-peptonada

Cloreto de sódio	8,5 g
Peptona	1,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

Distribuir em frascos em volumes apropriados.

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min.

b) Solução de citrato de sódio

Citrato de sódio	1,25 g
Água destilada	100 ml

Dissolver o citrato de sódio em água destilada.
Distribuir em frascos em volumes apropriados
Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min.

c) Solução salina a 0,85%

Cloreto de sódio	0,85 g
Água destilada	100 ml

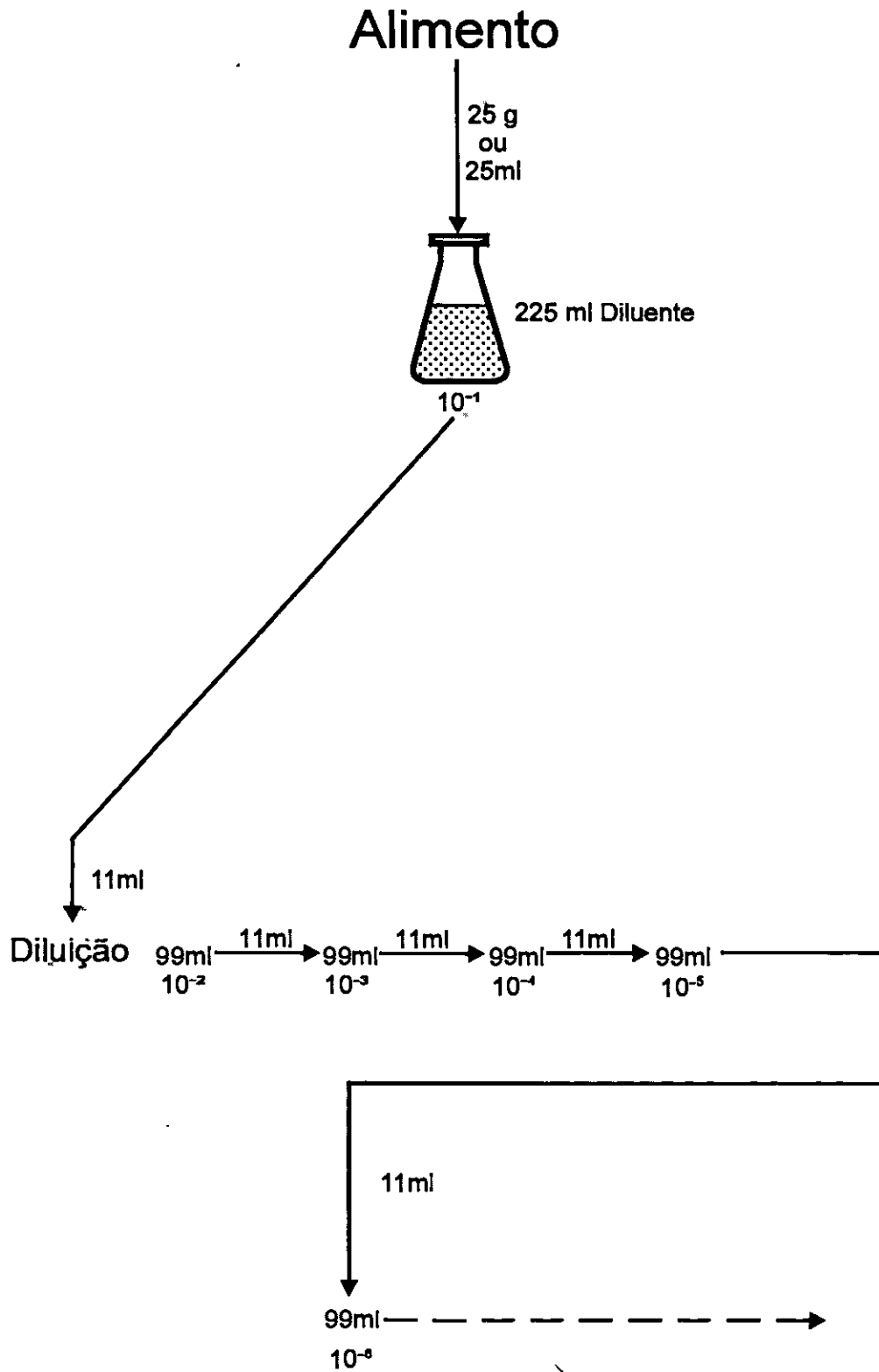
Dissolver o cloreto de sódio em água destilada.
Distribuir em frascos em volumes apropriados.
Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min.

4.3.2. Soluções desinfetantes

- a) Solução de hipoclorito de sódio - 100 mg/litro (100 ppm)
- b) Solução de álcool iodado

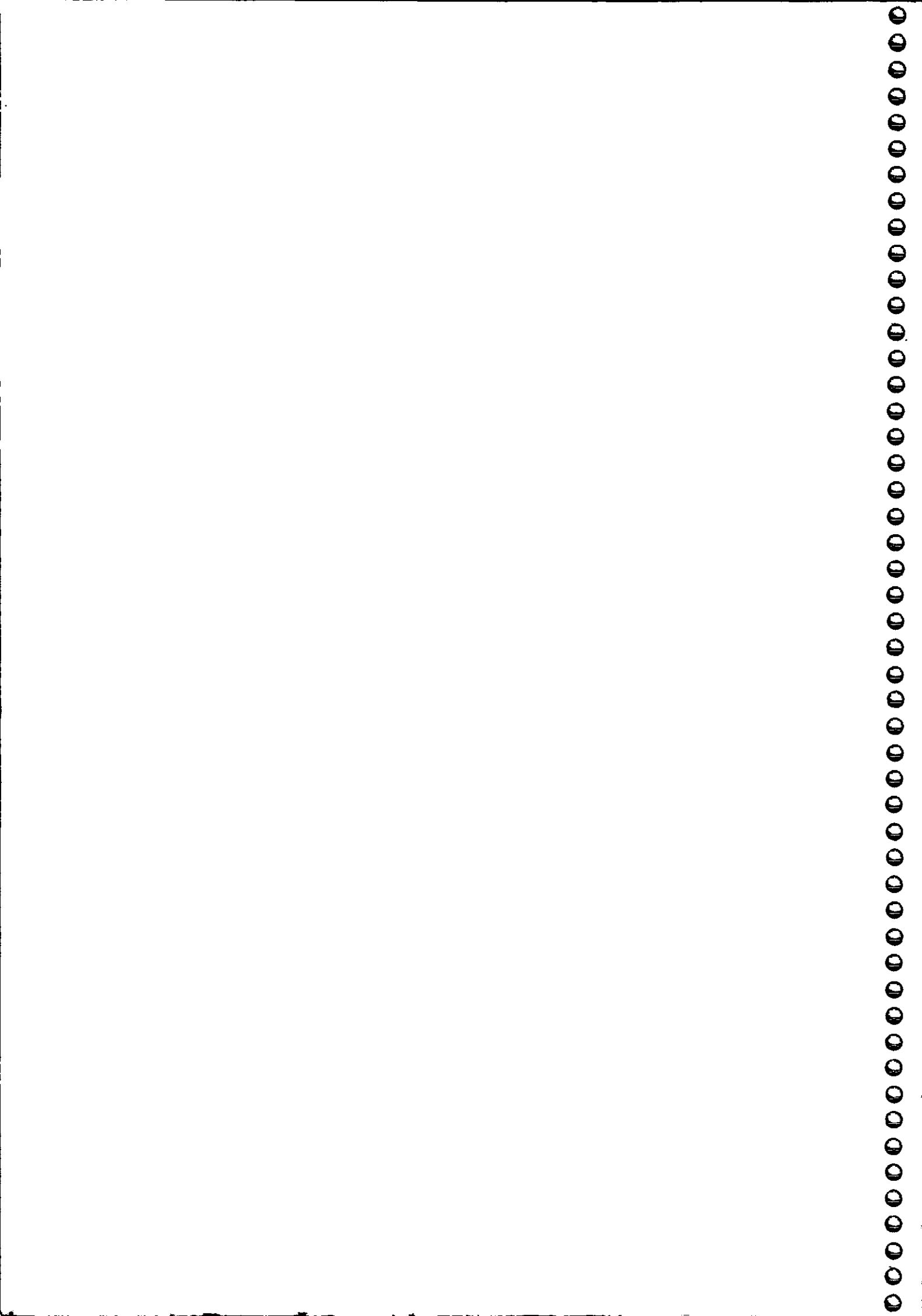
Iodo	2,0 g
Álcool etílico a 70%	100 ml

FIG. 1. Esquema das diluições sucessivas.



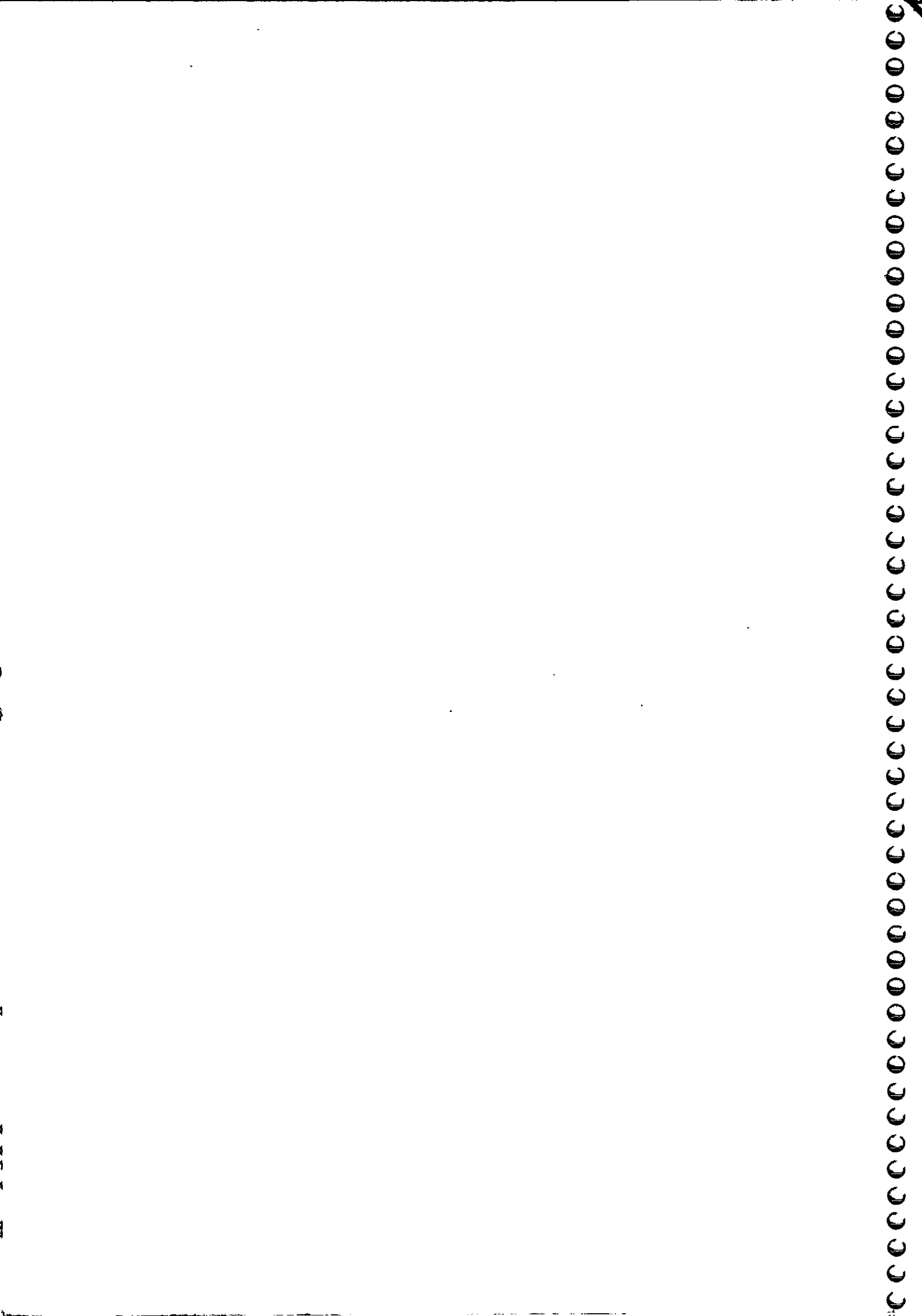
5. Normas de trabalho no laboratório

- a) no início de cada análise traçar um plano de trabalho considerando o tempo necessário para uma análise, que não deve ser superior a 20 min., da diluição à inoculação. Os tempos para leituras, repicagens, também devem ser previstos;
- b) trabalhar sempre de maneira ordenada, tranqüila, constante e metódica, evitando movimentos desnecessários, bem como corrente de ar dentro do laboratório;
- c) limpar e desinfetar a superfície das mesas, balcões, etc; antes e depois do trabalho de cada dia;
- d) efetuar registro de análise, anotando tipo, procedência, dia e hora de chegada do produto no laboratório e qualquer outra observação prévia a análise;
- e) preencher boletim de acompanhamento, em consonância com os dados do registro da amostra;
- f) identificar as amostras, bem como o material a ser utilizado, antes de iniciar a análise. As amostras em geral não devem ser descartadas até obter-se os resultados;
- g) tocar o material a analisar exclusivamente com materiais estéreis (nunca com as mãos);
- h) no caso de derramamento de material contaminado, proceder imediatamente a desinfecção e esterilização;
- i) todo material utilizado na análise, tais como lâminas, pipetas, etc., devem ser colocados em recipientes contendo solução desinfetante;
- j) o material utilizado deve receber a seguinte seqüência de tratamento:
 - esterilização
 - lavagem
 - secagem
 - embalagem e esterilização
 - armazenamento
- k) os cultivos após a leitura devem ser esterilizados;
- l) manter registro de controle diário de temperatura das estufas e banhos termostatizados;
- m) realizar o controle diário de contaminação ambiental do laboratório, câmara asséptica e fluxo laminar.



6. Normas de higiene e ordem pessoais

- a) usar avental ou guarda-pó e, se possível, touca e máscara;
- b) manter no laboratório exclusivamente os materiais necessários aos trabalhos de análises;
- c) se for portador de algum ferimento nas mãos, não deve participar dos trabalhos de análise. No caso de necessidade extrema, fazer uma boa sanificação das mãos, especialmente do ferimento, e utilizar luvas, procedendo também a sanificação das mesmas;
- d) lavar e usar sanificante nas mãos ao entrar, sempre que for necessário e ao sair do laboratório;
- e) não fumar, comer ou ingerir líquidos no laboratório;
- f) evitar tocar o corpo e especialmente os olhos, boca, nariz com as mãos durante os trabalhos no laboratório. Em caso de necessidade de fazê-lo proceda a lavagem e sanificação das mãos antes e após o ato;
- g) não umedecer etiquetas ou outro material do laboratório com a língua;
- h) não utilizar lenços de uso pessoal ou avental para limpar objetos ou instrumentos de trabalho no laboratório;
- i) em casos de acidente com ferimentos e cortes, proceder imediatamente a lavagem e a desinfecção;
- j) comunicar imediatamente qualquer suspeita de haver contraído uma enfermidade no laboratório.



7. Contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas (contagem padrão em placas)

7.1. Significado nos alimentos

Esta contagem detecta, em um alimento, o número de bactérias aeróbias ou facultativas e mesófilas presentes tanto sob forma vegetativa quanto esporulada.

A contagem padrão em placas (PCA) tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação. Sua presença em grande número indica:

- a) matérias-primas excessivamente contaminadas;
- b) limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas;
- c) higiene inadequada na produção;
- d) condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou a conservação dos alimentos, ou uma combinação destas circunstâncias.

7.2. Meio de cultura

7.2.1. Ágar padrão para contagem (PCA)

a) Composição:

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,0 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

7.3. Metodologia e técnicas de análise

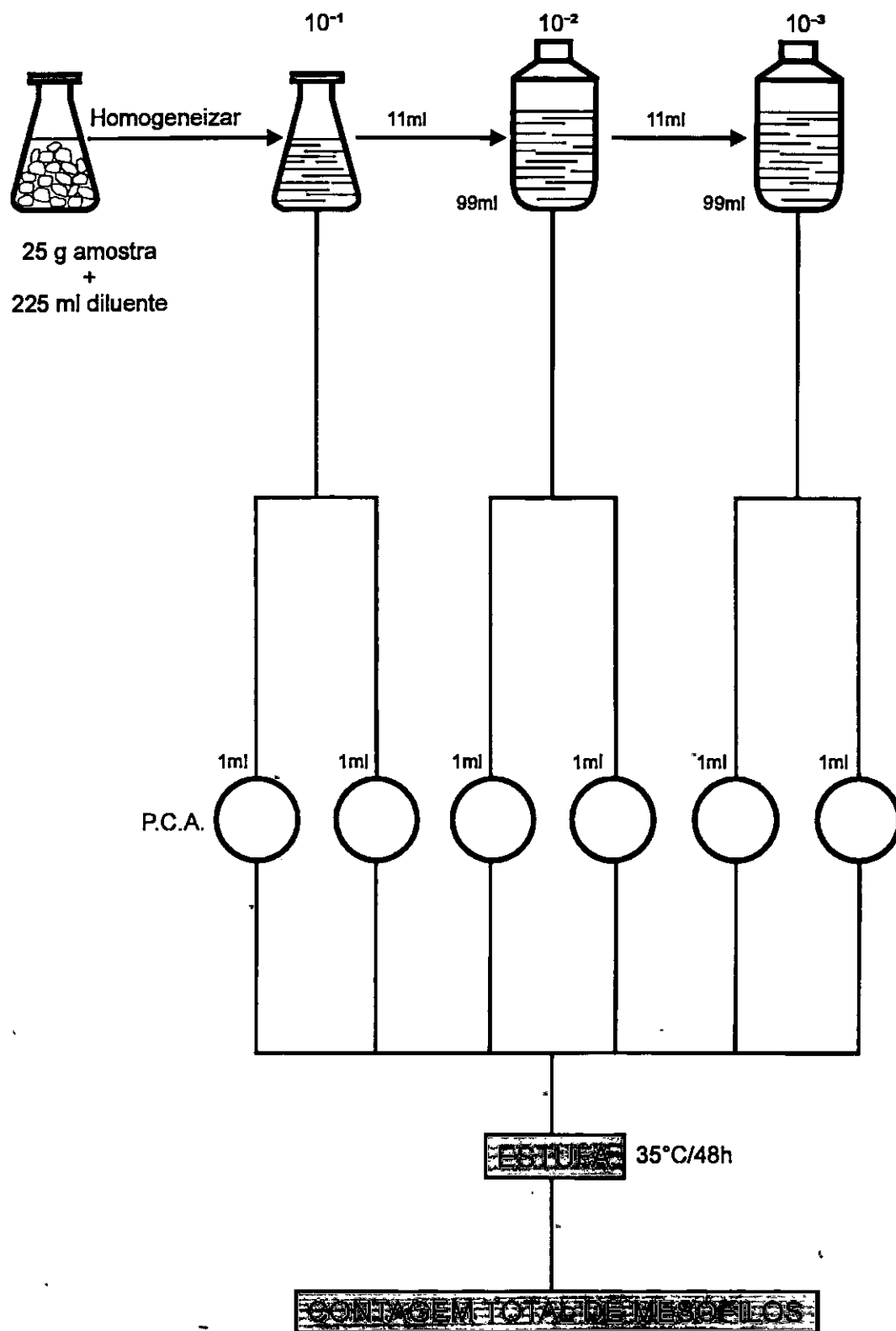
7.3.1. Técnica de análise (Fig. 2)

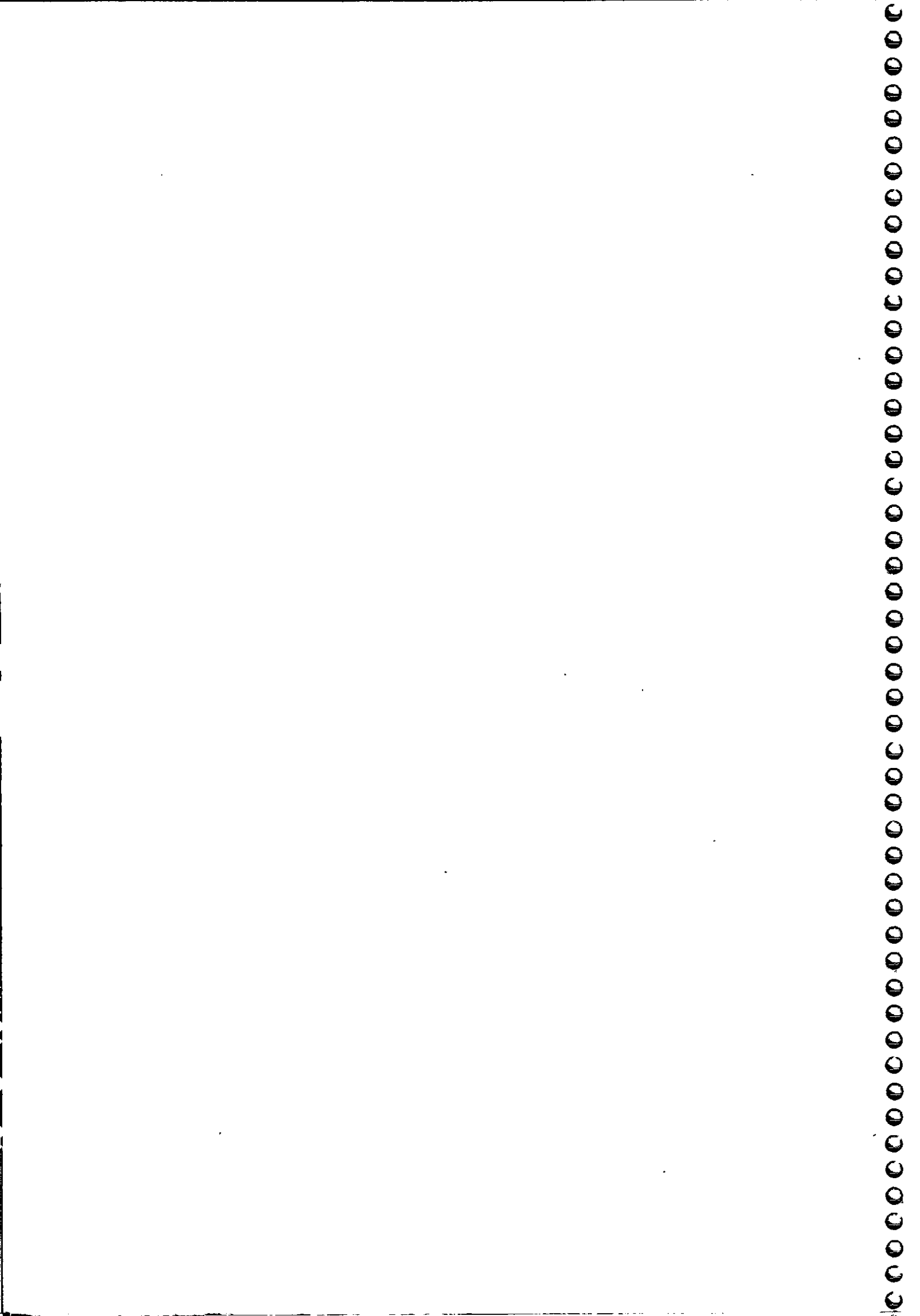
- a) retirar assepticamente 25 g ou 25 ml da amostra e preparar diluições sucessivas, conforme descrito no item 4.3;
- b) pipetar alíquotas de 1 ml de cada diluição para placas de Petri (100 x 20 mm) esterilizadas, fazendo de cada diluição placas em duplicatas;
- c) adicionar a cada placa 15-20 ml de ágar padrão para contagem, previamente fundido e resfriado à temperatura de 44 a 46°C;
- d) homogeneizar com movimentos suaves, em forma de oito (cerca de 10 vezes) e deixar a temperatura ambiente até a completa solidificação do ágar;
- e) após a solidificação, incubar as placas em posição invertida a 35-37°C/48 horas.

7.3.2. Resultado

Transcorrido o tempo de incubação, considerar para contagem, somente as placas da mesma diluição que apresentarem de 30 a 300 colônias; multiplicar a média aritmética das mesmas pelo respectivo fator de diluição e expressar o resultado em Unidades Formadoras de colônias/1,0 g de amostra (UFC/g).

FIG. 2. Esquema da técnica de análise da contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas.





8. Contagem de fungos filamentosos e leveduras

8.1. Fungos filamentosos (Bolors)

São fungos filamentosos, multicelulares, obtêm sua alimentação de matéria orgânica inanimada ou nutrem-se, como parasitas, de hospedeiros.

Estão bem difundidos na natureza, estando presente no solo, no ar, na água e em matéria orgânica em decomposição.

Alguns destes fungos são benéficos ao homem, auxiliando na indústria alimentícia (como por exemplo na maturação de queijos) bem como na indústria farmacêutica na produção de penicilina e outros.

Outros são prejudiciais, causando doenças vegetais, humanas e animais, e dentro deste grupo há ainda aqueles produtores de micotoxinas como aflatoxinas (Fig. 3).



FIG. 3 Ágar batata dextrose com crescimento de fungos filamentosos.

8.2. Leveduras (Fungos não-filamentosos)

Como os fungos filamentosos, certas leveduras são benéficas, sendo utilizadas na produção de cervejas, vinho e bebidas alcoólicas em geral; na síntese de certas vitaminas, e ou outros produtos; entretanto, existem aquelas que deterioram alimentos ou provocam doenças nos vegetais e animais.

Estes fungos não-filamentosos estão bem difundidos na natureza, sendo disseminados por insetos vetores, pelo vento e pelas correntes aéreas.

8.3. Significado nos alimentos

A presença de fungos filamentosos e leveduras viáveis e em índice elevado nos alimentos, pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos; multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem; matéria-prima com contaminação excessiva.

Em produtos de tomate, frutas e outros, a contagem de filamentos de fungos é de grande importância no sentido de se aquilatar a qualidade da matéria-prima utilizada no processamento, bem como o rigor na seleção.

8.4. Características fisiológicas

Fungos filamentosos e leveduras são capazes de se desenvolverem em produtos com atividade aquosa baixa, 0,80 e 0,88 para maioria dos fungos filamentosos e leveduras deteriorantes, respectivamente. Entretanto, algumas leveduras osmofílicas e fungos filamentosos xerofílicos são capazes de se multiplicarem em produtos com menores atividades de água (cerca de 0,62); o grupo, portanto, é de importância em alimentos conservados pelo uso do açúcar, do sal e desidratados.

A característica de se multiplicarem em uma ampla faixa de pH entre 2,0 e 8,5, torna o grupo importante também para produtos ácidos (frutas e produtos de frutas, conservas ácidas, vegetais fermentados e outros). Desta forma, são os principais deteriorantes de alimentos com pH inferior a 4,0-4,5, nos quais se multiplicam com facilidade.

Com relação à temperatura, a maioria dos fungos filamentosos e leveduras são mesófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 25-30°C. Espécies psicrotróficas, entretanto, fazem com que, especialmente os fungos filamentosos, sejam problemáticos como deteriorantes de produtos refrigerados e congelados (carnes e derivados e produtos de laticínio, principalmente).

Em decorrência da atividade pectinolítica e celulolítica de muitas espécies de fungos filamentosos, este grupo está frequentemente associado a deterioração de vegetais "in natura".

Os fungos filamentosos são aeróbios, desenvolvem-se na superfície dos alimentos ou onde haja presença do ar. Já as leveduras têm espécies aeróbias estritas e espécies facultativas, sendo que estas últimas provocam a fermentação alcoólica de alimentos.

8.5. Meio de cultura

8.5.1. Ágar batata dextrose (BDA)

a) Composição:

Infusão de batata	200	ml
Dextrose	20,0	g
Ágar	15,0	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada.

Aquecer até a completa dissolução.

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min.

Observações:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.
2. Na hora da utilização, adicionar ao meio basal, já fundido, quantidade pré-estabelecida de uma solução esterilizada de ácido tartárico a 10%, para levar o pH a $3,5 \pm 0,1$.

8.6. Metodologia e técnicas de análise

8.6.1. Técnica de análise (Fig. 4)

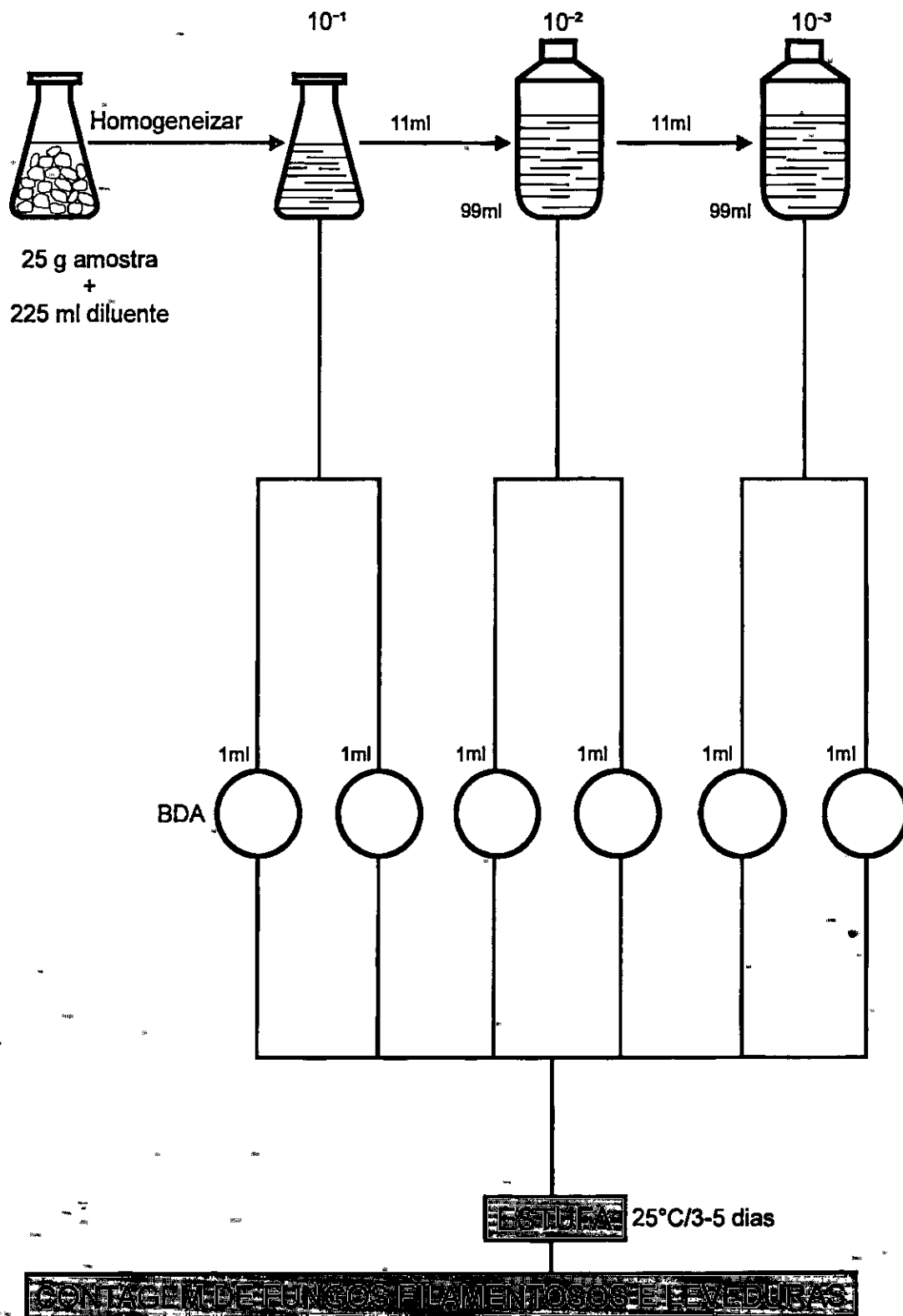
- a) retirar assepticamente 25 g ou 25 ml da amostra e preparar as diluições sucessivas como descrito no item 4.3;
- b) pipetar alíquotas de 1 ml de cada diluição para placas de Petri (100 x 20 mm) esterilizadas, fazendo de cada diluição placas em duplicatas;
- c) adicionar à cada placa, 15-20 ml do ágar batata dextrose, previamente fundido, resfriado a 44-46°C e acidificado com o ácido tartárico;
- d) homogeneizar, com movimentos suaves em forma de oito, sucessivamente, por 10 vezes. Deixar solidificar a temperatura ambiente;
- e) incubar as placas em posição invertida a 20-25°C por 3 a 5 dias.

8.6.2. Resultado

Transcorrido o período de incubação, considerar para contagem, somente as placas, da mesma diluição, que apresentarem de 30 a 300 colônias.

Após a contagem, multiplicar a média aritmética das duas placas pelo fator da diluição correspondente, expressando o resultado em Unidades formadoras de Colônias/1,0 g de amostra (UFC/g). Em certos casos, é interessante a contagem ser expressa separadamente para fungos filamentosos e para levedura, pois ajudam a interpretação dos resultados.

FIG. 4. Esquema da técnica da contagem de fungos filamentosos e leveduras.



9. Contagem de bactérias lácticas

9.1. Identificação

Uma grande variedade de bactérias produtoras de ácido e/ou ácido tolerantes estão distribuídas na natureza, podendo ser encontradas no solo e em produtos agrícolas frescos ou processados. Um dos mais importantes grupos de bactérias produtoras de ácidos em alimentos industrializados é o das bactérias lácticas, constituído das espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. No gênero *Lactobacillus*, pode haver espécies homofermentativas, as quais produzem basicamente ácido láctico a partir de açúcares, ou heterofermentativas, as quais além do ácido láctico (menos de 85% dos produtos de metabolismo), podem excretar ácido acético, etanol e CO₂. Desta forma, pode-se encontrar estufamento ou produção de gases em alimentos, em decorrência da atividade destes tipos (heterofermentativos). As espécies de *Streptococcus* e *Pediococcus* são sempre homofermentativas, e as de *Leuconostoc*, sempre heterofermentativas.

9.2. Significado nos alimentos

As bactérias lácticas são importantes nas indústrias de laticínios, de produtos cárneos e de vegetais, por participarem no processamento de diversos alimentos tais como os leites fermentados, queijos, salames, produtos fermentados de soja e de outros vegetais, e também por provocarem alterações, traduzidas pela acidificação, turvação, estufamentos, modificações de odor e sabor.

A contagem de bactérias lácticas é importante em determinados alimentos, especialmente naqueles em que a conservação está baseada no abaixamento do pH (acidificados) e nos produtos naturalmente ácidos. Exemplos são as frutas, sucos de frutas, refrigerantes, bebidas (vinho, cervejas). Nos produtos cárneos, sua importância está associada por compor a microbiota desse tipo de indústria, bem como das condições de processamento, embalagem e estocagem dos produtos cárneos. Assim, a contagem de bactérias lácticas em certos produtos ácidos (especialmente derivados de frutas) e cárneos (com exceção dos produzidos com a participação de bactérias inoculadas), podem fornecer indicações sobre a higiene na produção bem como estimar o tempo de prateleira dos mesmos. A presença de um grande número de bactérias lácticas no alimento, tem como principais causas:

- a) matérias-primas muito contaminadas;
- b) limpeza e sanificação inadequadas dos equipamentos utensílios;
- c) condições inadequadas de processamento, especialmente com relação a exposição do produto a temperaturas de multiplicação;
- d) contaminações cruzadas.

9.3. Meios de cultura

9.3.1. Ágar soro de laranja

Indicado para contagem de microrganismos deteriorantes, ácido tolerantes, em sucos e frutas e frutos cítricos.

Por conter extratos de laranja, este meio oferece boas condições para crescimento da microflora existente nos sucos cítricos, tais como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, fungos filamentosos, leveduras e outros, sendo desta forma recomendado para controle de fabricação nas indústrias de sucos de frutas e refrigerantes.

a) Composição:

Peptona de caseína (Tryptona ou Tripticase)	10,0	g
Extrato de levedura	3,0	g
Soro de laranja	200	g
Glicose	4,0	g
Cisteína	0,001	g
Hidrogenofosfato de potássio	2,5	g
Ágar	17,0	g
Água destilada	800	ml

Para preparar o soro, aquecer a aproximadamente 93°C, um litro de suco de laranja recém extraído.

Filtrar com sucção através de um funil de Buchner, usando papel de filtro.

Desprezar os primeiros mililitros do filtrado.

Preparar o meio de acordo com o indicado na composição.

Aquecer até a completa dissolução.

Esterilizar a 121°C/15 minutos.

O pH deve ser de aproximadamente 5,5.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

9.3.2. Ágar seletivo para *Lactobacillus* (Meio Rogosa)

Este meio é utilizado para o isolamento e contagem de *Lactobacillus* de carnes e produtos cárneos, leite e produtos lácteos bem como de outros alimentos. A seletividade do meio está baseada na elevada concentração de acetato e o pH baixo, os quais inibem a microbiota acompanhante.

Peptona de caseína	10,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Glicose	20,0	g
Dihidrogenofosfato de potássio	6,0	g
Citrato de amônia	2,0	g
Monooleato de sorbitol	1,0	g
Acetato de sódio hidratado	25,0	g
Sulfato de magnésio	0,575	g
Sulfato de ferro (II)	0,034	g
Sulfato de manganês	0,12	g
Ágar	15,0	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os ingredientes sob aquecimento elevando a temperatura até a ebulição.

Não esterilizar o meio.

Ajustar o pH a 5,4 com ácido acético a 96% (\pm 1,3 ml por litro).

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

9.3.3. Ágar para *Lactobacillus* seg. DE Man, Rogosa e Sharpe (ÁGAR M.R.S.)

O meio é utilizado para contagem de lactobacilos em todos os tipos de alimentos. Em virtude da pouca seletividade, podem crescer também espécies de *Pediococcus*, *Leuconostoc* e outras. A seletividade do meio deve-se ao polisorbato, acetato, magnésio (fatores estimulantes do crescimento de *Lactobacillus*) da formulação, que é rica em nutrientes, bem como a incubação em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂.

a) **Composição:**

Peptona universal	10,0 g
Extrato de carne	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Glicose (D +)	20,0 g
Hidrogenofosfato de potássio	2,0 g
Tween 80	1,0 g
Citrato de tri-amônio	2,0 g
Acetato de sódio	5,0 g
Sulfato de magnésio 7.H ₂ O	0,1 g
Sulfato de manganês 4.H ₂ O	0,05 g
Ágar	12,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os ingredientes em água destilada submetendo-os ao aquecimento.

Esterilizar a 121°C/15 min.

O pH final do meio deve ser 6,5 ± 0,1.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

9.4. Metodologia e técnicas de análise

9.4.1. Técnica de análise (Fig. 5)

- retirar assepticamente 25 g ou 25 ml da amostra e preparar diluições sucessivas conforme descrito no item 4.3;
- pipetar alíquota de 1 ml de cada diluição para placas de Petri (100 x 20 mm) esterilizadas;
- fazer de cada diluição placas em duplicatas;
- adicionar, a cada placa, 15-20 ml do meio de cultura selecionado, previamente fundido e resfriado à temperatura de 44-46°C;
- homogeneizar com movimentos suaves, em forma de oito, sucessivamente por dez vezes, e deixar à temperatura ambiente até a completa solidificação do ágar;

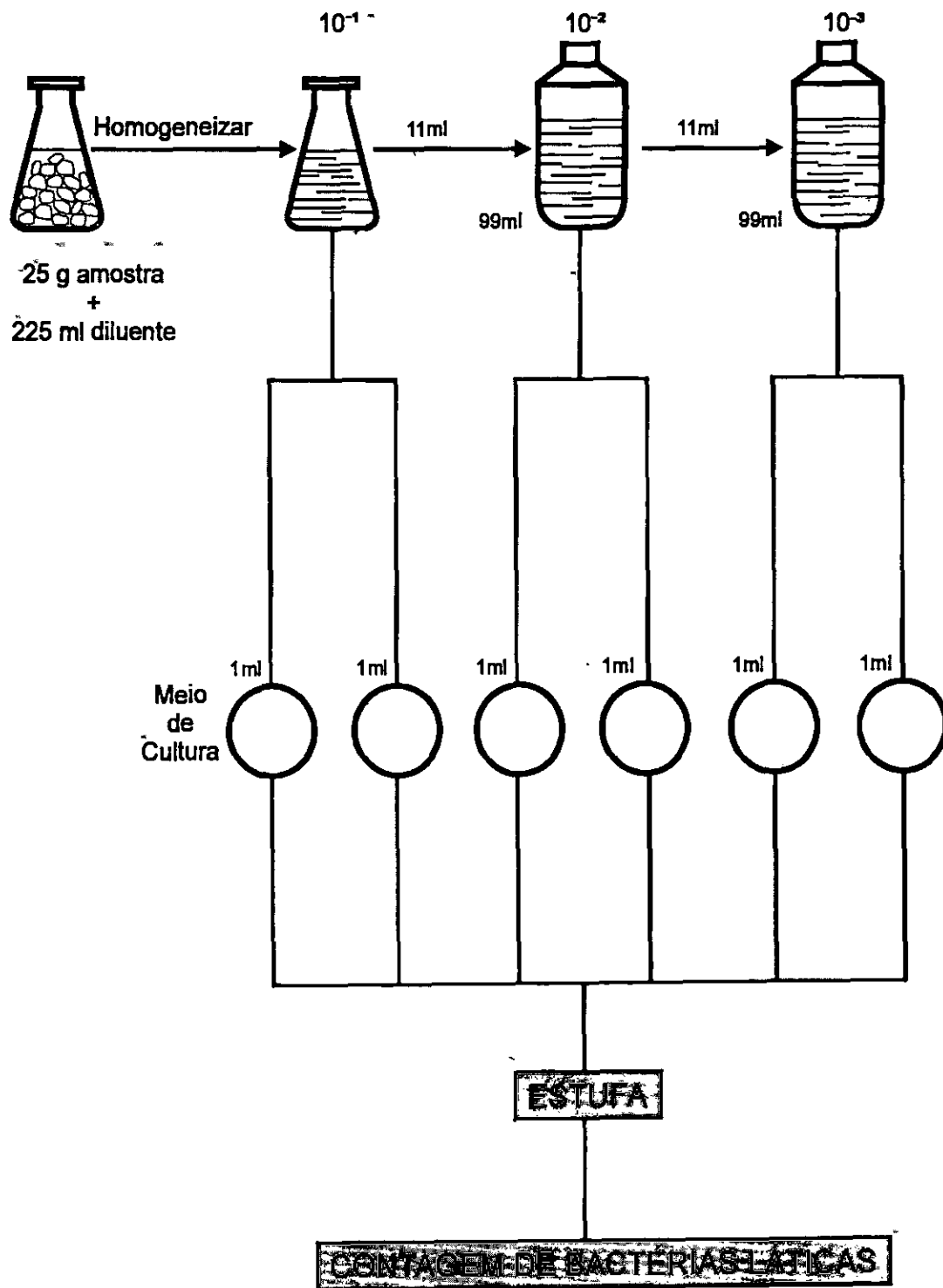
f) incubação:

- Ágar soro de laranja a 30°C/5 dias ou a 37°C/3 dias.
- Ágar rogosa sob condições de anaerobiose e atmosfera com 5% de CO₂ a 30°C/5 dias ou a 37°C /5 dias.
- Ágar MRS: sob condições de atmosfera com 5% de CO₂ e câmara úmida, a 30°C /5 dias ou 37°C /3 dias.

9.4.2. Resultado

Transcorrido o tempo de incubação, considerar para contagem as placas de mesma diluição que apresentarem de 30 a 300 colônias, multiplicar a média aritmética das contagens pelo respectivo fator de diluição e expressar o resultado em Unidades Formadoras de Colônias/g de amostra (UFC/g).

FIG. 5. Esquema da técnica de contagem de bactérias lácticas.



10. Enterobactérias

10.1. Identificação

Segundo o Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey's de 1984:

Seção 5 - Bastonetes Gram-Negativos/anaeróbios facultativos

FAMÍLIA	I	<i>Enterobacteriaceae</i>
GÊNERO	II	<i>Escherichia</i>
GÊNERO	III	<i>Shigella</i>
GÊNERO	IV	<i>Salmonella</i>
GÊNERO	V	<i>Klebsiella</i>
GÊNERO	VI	<i>Enterobacter</i>
GÊNERO	XI	<i>Proteus</i>
GÊNERO	XIV	<i>Yersinia</i>

10.2. Gênero I: *Escherichia* (Grupo Coliforme)

O gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme. Estes gêneros apresentam em comum as características de serem bastonetes curtos, Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose com produção de ácido e gás dentro de 24-48 horas de incubação, à temperatura de 32-37°C.

O hábitat das bactérias que pertencem ao grupo coliforme é o trato intestinal do homem e de outros animais; entretanto, espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* podem persistir longos períodos e se multiplicar em ambientes não fecais.

Na contagem de coliformes pode-se diferenciar dois grupos: o de coliformes totais e o de coliformes fecais. O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpezas e sanificações deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem.

O índice de coliformes fecais é empregado como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias, visto presumir-se que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *E. coli*, que tem seu hábitat exclusivo no trato intestinal do homem e de outros animais. Assim, sua presença indica possibilidade de ocorrerem outros microrganismos entéricos na amostra. Por outro

lado, alguns sorotipos de *E. coli* são responsáveis por gastroenterites, especialmente em crianças, pessoas idosas ou convalescentes, sendo a diarreia o principal sintoma, com tempo de incubação de 6 a 36 horas e duração de dois dias.

A enumeração de coliformes pode ser efetuada em meios de cultura líquidos (técnica do número mais provável - NMP) ou em meios sólidos.

10.2.1. Técnica do número mais provável(NMP)

Por esta técnica, pode-se obter informações sobre a população presuntiva de coliformes, (teste presuntivo); sobre a população real de coliformes (teste confirmativo) e sobre a população de coliformes de origem fecal (coliformes fecais).

Ela é indicada quando se deseja detectar baixos números de coliformes na amostra, por ser mais sensível do que os métodos de plaqueamento.

a) **teste presuntivo:** o teste presuntivo visa detectar a presença de microrganismos fermentadores de lactose, especialmente os grupo coliforme. Células estressadas por tratamentos térmicos, pelo congelamento ou outro motivo, podem ser recuperadas nessa fase.

- **princípio:** o teste baseia-se na utilização de um meio de cultura rico em nutrientes, facilitando o rápido crescimento dos microrganismos. Oferece como fonte de carbono apenas lactose, a qual é fermentada pelos coliformes com produção de ácidos e gás, que é evidenciado no tubo de Durham. O meio contém ainda o lauril sulfato que inibe consideravelmente o crescimento da flora acompanhante.

b) **teste confirmativo (coliformes totais):**

- **princípio:** o meio utilizado, o “Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2%”, contém dois inibidores (Bile e Verde Brilhante) do crescimento da microflora acompanhante, especialmente bactérias gram positivas, e a lactose, como único carboidrato. Assim, a produção de gás nos tubos, nas condições do teste, indicam que houve desenvolvimento de bactérias gram negativas que fermentaram lactose, características do grupo coliforme.

c) **coliformes fecais:**

- **princípio:** o teste baseia-se na utilização de um meio de cultura seletivo “Caldo E.C.” e incubação a temperaturas superiores às normais (44,0-45,5°C). A positividade do teste é observada na produção de gás no interior dos tubos de fermentação (tubos de Durham).

10.2.2. Técnica de contagem em placas

Neste método utiliza-se a técnica de diluições sucessivas e plaqueamento por incorporação do meio de cultura.

10.2.3. Meios de cultura

10.2.3.1. Caldo lauril sulfato triptose (Caldo LST)

a) Composição:

Triptose, Triptona ou Tripticase	20,0 g
Lactose	5,0 g
Hidrogenofosfato de potássio	2,75 g
Dihidrogenofosfato de potássio	2,75 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Lauril Sulfato de Sódio	0,10 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser de $6,8 \pm 0,2$.

Distribuir volumes de 10 ml de meio em tubos de 16 x 150 mm, contendo tubos de fermentação (tubos de Durham invertidos) caso do meio em concentração dupla, distribuir 10 ml em tubos de 18 x 200 mm.

Observação:

1. Para preparar concentração dupla dissolver os componentes em 500 ml de água destilada.
2. Na forma desidratada, proceder conforme as instruções do fabricante.

b) Características do Crescimento: são considerados positivos os tubos que têm a presença de gás nos tubos de Durham (Figs. 6 e 7).

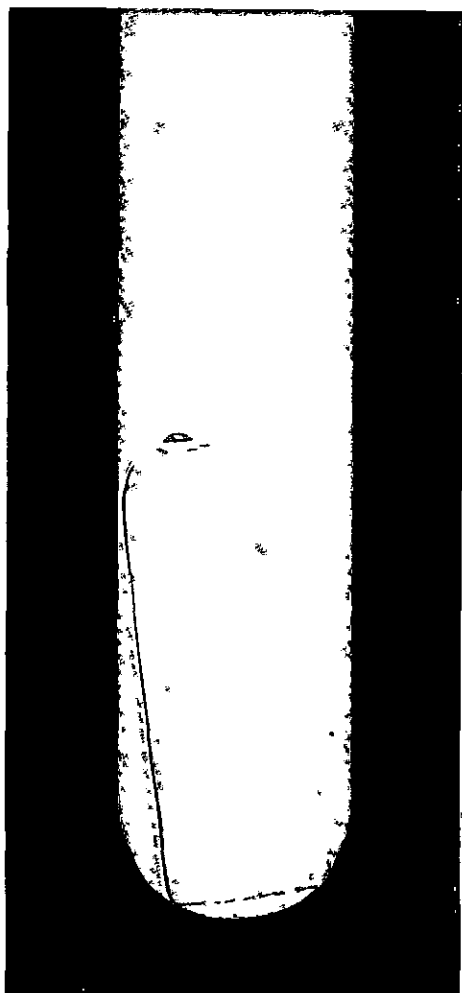


FIG. 6 Tubo com caldo LST sem crescimento.

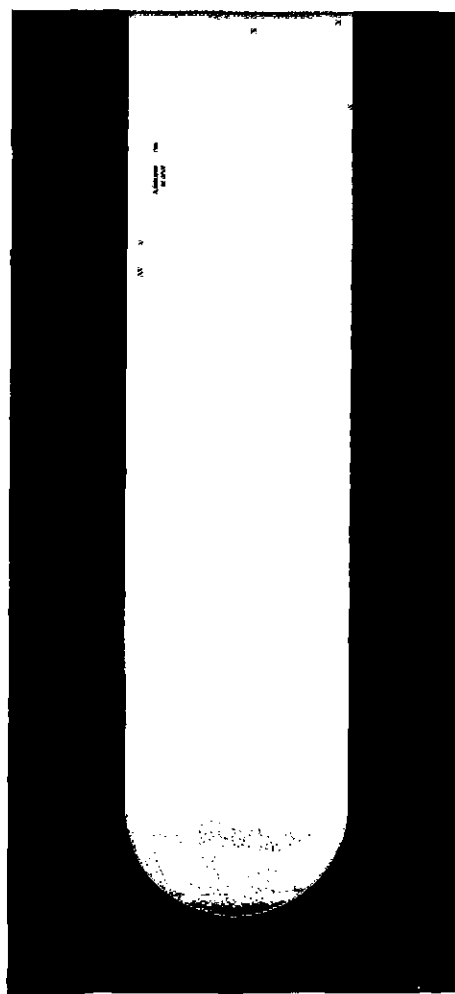


FIG. 7 Tubo com caldo LST com produção de gás (tubo positivo).

10.2.3.2. Caldo verde brilhante lactose bile a 2% (Caldo Brila)

a) Composição:

Peptona	10,0	g
Lactose	10,0	g
Bile de boi desidratada	20,00	g
Verde brilhante	0,0133	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada e submeter a um leve aquecimento para dissolução.

Distribuir cerca de 10 ml por tubo (13 x 150 mm), contendo tubo de Durham invertido.

Esterilizar, em autoclave a 121°C/15 min.

O pH final do meio deve ser $7,1 \pm 0,1$,

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

10.2.3.3. Caldo EC

a) Composição:

Triptona ou Trypticase	20,0 g
Sais biliares	1,5 g
Lactose	5,0 g
Hidrogenofosfato de potássio	4,0 g
Dihidrogenofosfato de potássio	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

Submeter a um leve aquecimento para dissolução dos componentes do meio.

Distribuir cerca de 10 ml por tubo (13 x 150 mm), contendo tubo de Durham invertido.

Esterilizar a 121°C/15 min.

O pH final deste meio deve ser $6,9 \pm 0,2$.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) Características do Crescimento: são considerados positivos os tubos que têm a presença de gás nos tubos de Durham (Figs. 8 e 9).

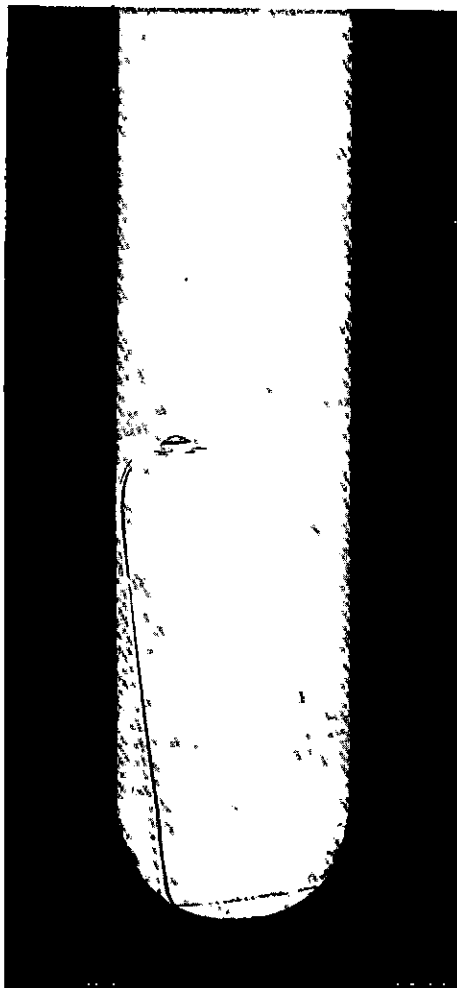


FIG:8 Tubo com caldo EC sem crescimento.



FIG:9 Tubo com caldo EC com produção de gás (tubo positivo).

10.2.3.4. Ágar eosina azul de metileno seg. Levine (Ágar EMB) (Fig. 10)

a) Composição:

Peptona	10,0	g
Lactose	10,0	g
Hidrogenofosfato de potássio	2,0	g
Eosina amarela	0,4	g
Azul de metileno	0,065	g
Ágar	15,0	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada.

Aquecer até a completa dissolução.

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min.

O pH final do meio deve ser 7,1 ± 0,1.

Esfriar o meio a 50-60°C.

Verter cerca de 15 ml do meio por placa de Petri (15 x 100 mm), previamente esterilizada.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

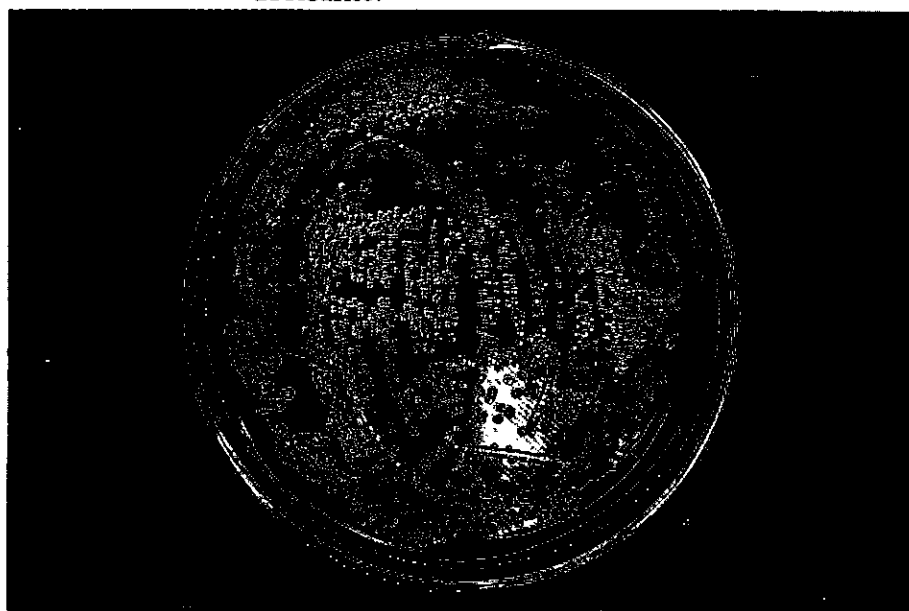


FIG. 10 Ágar EMB com crescimento característico e *E.coli*. Colônias de 2-3 mm de diâmetro, com o centro escuro, possuindo ou não, brilho verde metálico.

10.2.3.5. Ágar cristal violeta-vermelho neutro-bile (Ágar VRB) (Fig. 11)

a) Composição:

Extrato de Levedura	3,0 g
Peptona	7,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Sais biliares nº 3	1,5 g
Lactose	10,0 g
Vermelho neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada, deixando hidratar o ágar por alguns minutos.

Aquecer, com agitação freqüente, até a completa dissolução.

Não autoclavar.

Deixar em vapor fluente por cerca de 5 minutos.

O pH final deste meio dever ser $7,4 \pm 0,2$.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

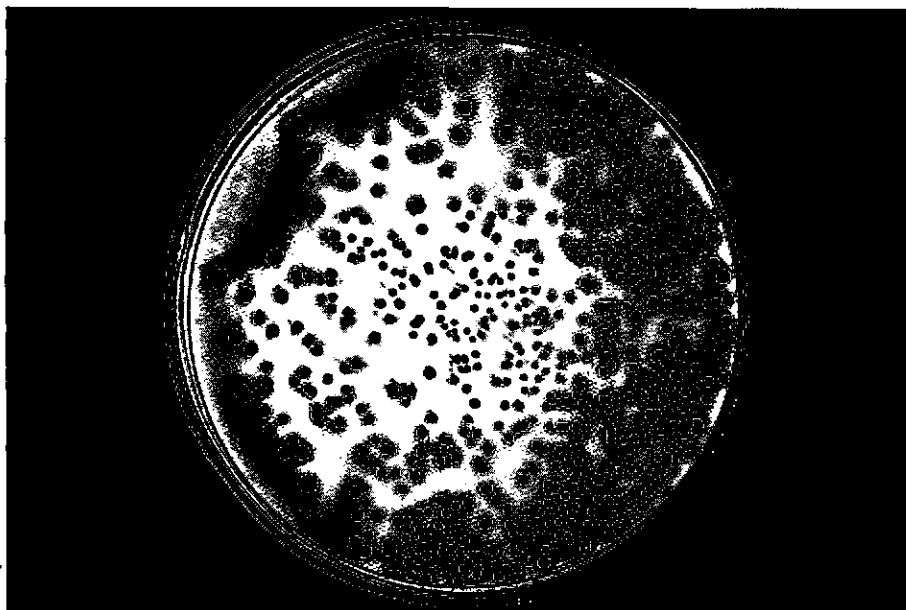


FIG. 11 Ágar VRB com crescimento característico de *E.coli*. Colônias de 1-2 mm de diâmetro, vermelhas com halo de precipitação rosado.

10.2.4. Metodologia e técnicas de análise

10.2.4.1. Técnica número mais provável (NMP) (Fig. 12)

a) teste presuntivo:

- retirar assepticamente 25 g ou 25 ml e preparar as diluições sucessivas, conforme descrito no item 4.3;
- pipetar alíquotas de 1 ml de cada diluição para uma série de três tubos de caldo LST;
- homogeneizar e incubar os tubos a 35°C/48 horas;
- transcorrido este tempo, observar a produção de gás nos tubos de fermentação (tubo de Durham) ou no meio, quando o tubo é agitado suavemente;

- anotar os tubos com produção de gás (tubos positivos);
- reportar a tabela do NMP para 3 diluições com 3 tubos em cada diluição (Tabela 1);
- o resultado em NMP de Coliformes/10 g ou 10 ml.

b) teste confirmativo:

- de cada tubo de caldo LST positivo, transferir uma alçada para um tubo de caldo brila, previamente identificado (diluição correspondente);
- incubar em estufa a $35\text{ C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas;
- considerar positivos os tubos com produção de gás no tubo de Durham;
- verificar na tabela de NMP o número correspondente e expressar o resultado em NMP de coliformes totais por grama ou ml (Tabela 1).

c) coliformes fecais:

- de cada tubo de caldo LST positivo, transferir uma alçada para um tubo de caldo EC previamente identificado (diluição correspondente);
- incubar em banho-maria a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ por 24 horas;
- considerar positivos os tubos com produção de gás no tubo de Durham;
- verificar na Tabela de NMP o número correspondente e expressar o resultado em NMP de coliformes fecais/g ou ml (Tabela 1).

d) *E.coli*

- todas as subculturas positivas em caldo EC são repicadas para ágar EMB, com auxílio de alça de platina ou de níquel cromo, fazendo estrias (por esgotamento). Para cada tubo positivo em caldo EC corresponderá uma placa (ou parte da placa) de ágar EMB, identificada, para a perfeita correspondência;
- incubar a $35^{\circ}\text{C}/18\text{-}24$ horas;
- transcorrido este tempo, verificar o crescimento de colônias com características de *E.coli*, ou seja, 2 a 3 mm de diâmetro, com brilho metálico esverdeado ou com o centro escuro abrangendo praticamente toda a colônia (Fig. 10);
- de cada placa (ou área de placa) correspondente a cada tubo, repicar de 2 a 3 colônias características para tubo com ágar nutriente inclinado, e incubar por 18-24 horas a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$;
- efetuar em cada cultura em ágar nutriente, as seguintes provas bioquímicas: indol (item 10.5.6); vermelho de metila-VM (item.10.5.9); Voges-Proskauer-VP (item 10.5.9); e citrato (item.10.5.1.). Este grupo de prova é denominado IMVIC;

- considerar a cultura positiva para *E.coli*, quando forem obtidos os seguintes resultados para o IMVIC:

Indol	VM	VP	Citrato	Tipo
+	+	-	-	<i>E.coli</i> típica
-	+	-	-	<i>E.coli</i> atípica

- considerar positivo o tubo de caldo EC para *E.coli*, quando pelo menos uma cultura dele proveniente for positiva no teste do IMVIC;
- verificar na tabela o NMP correspondentes aos tubos de EC positivos para a presença de *E.coli* e expressar o resultado em NMP de *E.coli* / g ou ml. (Tabela 1).

TABELA 1 - Tabela do número mais provável

Número de positivos	Tubos		NMP /g	Limite NMP	
	0,1	0,01		Inferior	Superior
0	0	0	< 3	-	-
0	0	1	3	0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130

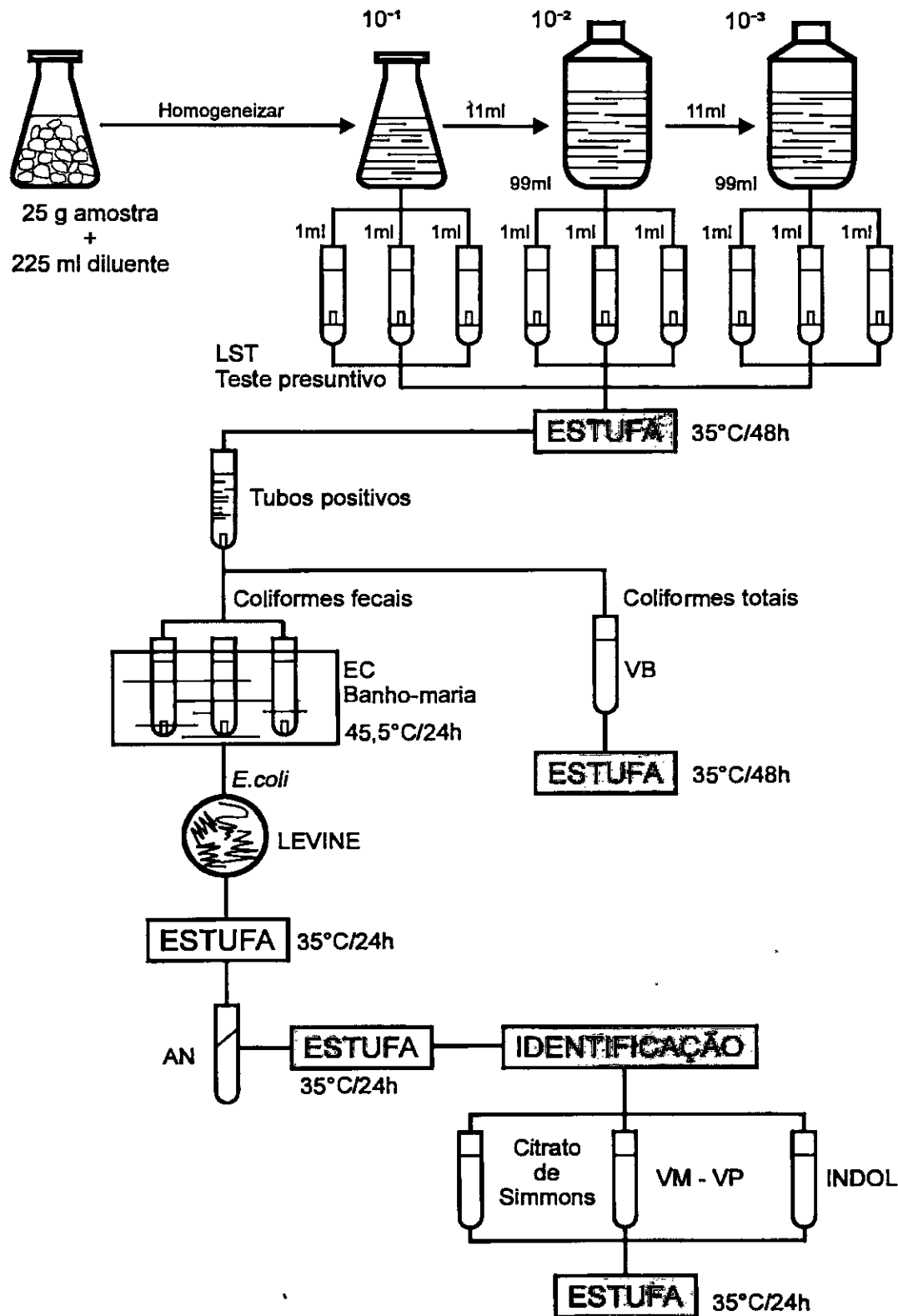
(Continua)

TABELA 1 - Continuação

Número de positivos					
Número de Tubos	Tubos		NMP /g	Limite NMP	
	0,1	0,01		Inferior	Superior
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	46	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	>2400	-	-

FONTE: SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C: APHA, 1976. 701p..

FIG. 12. Esquema da técnica do NMP (número mais provável).



10.2.4.2. Contagem em placas

- a) transferir, de cada diluição, alíquotas de 1 ml para placas de Petri (100 x 20 mm) esterilizadas;
- b) verter de 15 a 20 ml do ágar VRB, recém preparado, a uma temperatura de 45°C, nas placas inoculadas. Fazer a homogeneização com movimentos em oito e permitir a solidificação do meio;
- c) adicionar mais uma camada de ágar VRB (de 3 a 5 ml) sobre o meio solidificado;
- d) após solidificação total, incubar as placas em posição invertida a 35-37°C/24 horas;
- e) contar todas as colônias púrpuras ou vermelhas, circundada por uma zona rosada de bile precipitada (Fig. 11), e com cerca de 1-2 mm de diâmetro. Utilizar para contagem placas com 30 a 150 colônias;
- f) para confirmação de coliformes, repicar 10 colônias do ágar VRB para diferentes tubos de caldo brila, contendo tubo de Durhram. As dez colônias devem representar todos os tipos de colônias características de coliformes observadas;
- g) incubar os tubos a 35°C e examinar a produção de gás após 48 horas. Somente os tubos com produção de gás são positivos para coliformes;
- h) o número de coliformes totais/g é determinado multiplicando-se a percentagem dos tubos confirmados como positivos para o grupo pela contagem original no ágar VRB, multiplicado pelo fator de diluição.

10.3. Gênero III - *Salmonella*

10.3.1. Características básicas

- bastonetes
- Gram negativos
- não esporuladas
- móveis ou imóveis
- patogênicas
- facultativas
- pH para crescimento entre 4,5 e 8,0 (ótimo entre 6,0 e 7,5)
- temperatura para crescimento entre 5 e 46°C (ótima entre 35 e 37°C)
- atividade de água mínima de 0,93 a 0,96
- não fermenta a lactose

10.3.2. Hábítat natural

As salmonelas são muito difundidas, podendo estar presentes no solo, no ar, na água, em águas residuais, nos animais, nos seres humanos, nos alimentos, nas fezes, nos equipamentos. Entretanto, o seu hábitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e dos animais.

10.3.3. Alimentos propícios

Existem vários alimentos relacionados com a transmissão de salmonelas, a maioria deles de origem animal ou contaminados por alimentos de origem animal.

10.3.4. Sintomatologia

Presume-se que todas as espécies e cepas de salmonelas são patogênicas para o homem e os sintomas clínicos e patogênicos podem ser divididos em dois grupos:

- a) as febres tifóide e paratifóide causadas por *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*.

A febre tifóide é a mais grave delas, caracterizada por septicemia, com febre contínua, cefaléia e diarréia. Tem um período de incubação que usualmente varia de 7 a 21 dias.

A febre paratifóide é menos grave que a tifóide, podendo ocorrer septicemia e freqüentemente desenvolver o quadro de gastroenterite. O período de incubação é bem mais curto, variando, usualmente de 6 a 48 horas.

- b) as infecções entéricas produzidas por outras salmonelas. As salmoneloses causadas por *Salmonella* sp., desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, diarréia, febre, vômito, prostração. Raramente é fatal. Período de incubação geralmente é de 12 a 24 horas, podendo ocorrer entre 5 a 72 horas.

10.3.5. Meios de cultura

10.3.5.1. Caldo lactosado

- a) Composição:

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Lactose	5,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada, aquecendo se necessário.
Distribuir volumes de 225 ml desta solução em frascos erlenmeyer.
Autoclavar a 121°C/15 min.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

10.3.5.2. Água peptonada tamponada

a) Composição:

Peptona de carne	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Hidrogenofosfato de sódio	9,0 g
Dihidrogenofosfato de potássio	1,5 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.
O pH final deste meio deve ser $7,2 \pm 0,1$.
Distribuir volumes de 225 ml em frascos erlenmeyer.
Autoclavar a 121°C/15 min.

10.3.5.3. Caldo selenito-cistina (Caldo SC)

a) Composição:

Peptona de caseína	5,0 g
Cistina	0,01 g
Lactose	4,0 g
Monofosfato de sódio	10,0 g
Selenito de sódio	4,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada sob aquecimento e agitação constante.
O pH deste meio deve ser de $7,0 \pm 0,2$.
Distribuir volumes de 90 ml em frascos de diluição de leite.
Não autoclavar.
Ferver por 10 minutos em banho-maria.

Observações:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.
2. Usar no mesmo dia de sua preparação.

10.3.5.4. Caldo de enriquecimento tetracionato (base) (Caldo TT)

a) Composição:

Peptona de caseína	2,5 g
Peptona de carne	2,5 g
Mistura de sais biliares	1,0 g
Carbonato de cálcio	10,0 g
Tiosulfato de sódio	19,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada, aquecendo até a fervura.

Distribuir volumes de 90 ml em frascos de diluição de leite.

Não autoclavar.

Ferver por 10 minutos em banho-maria.

Observações:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante;
2. Na hora da utilização adicionar, para cada 90 ml do meio:

• solução aquosa de iodo	1,8 ml
• solução de verde brilhante a 0,1%	0,9 ml

*** Solução aquosa de iodo**

iodo	6,0 g
iodeto de potássio	5,0 g
Água destilada	20,0 ml

3. Usar no mesmo dia de sua preparação.

10.3.5.5. Ágar verde brilhante (Ágar BG)

a) Composição:

Proteose-peptona	10,0	g
Extrato de levedura	3,0	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Verde brilhante	0,0125	g
Lactose	10,0	g
Sacarose	10,0	g
Vermelho de fenol	0,08	g
Ágar	20,0	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $6,9 \pm 0,2$.

Aquecer até a completa dissolução.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Resfriar à uma temperatura de $50-60^{\circ}\text{C}$

Verter em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) **Característica do Crescimento:** colônias de vermelho a rosadas com halo vermelho são características de microrganismos lactose e sacarose negativos, como por exemplo a *Salmonella* (Figs. 13 e 14).

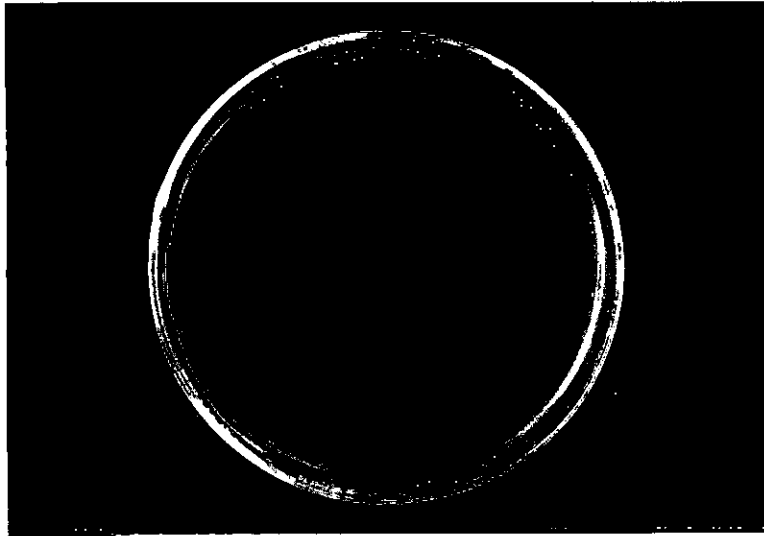


FIG. 13 Ágar BG sem crescimento.

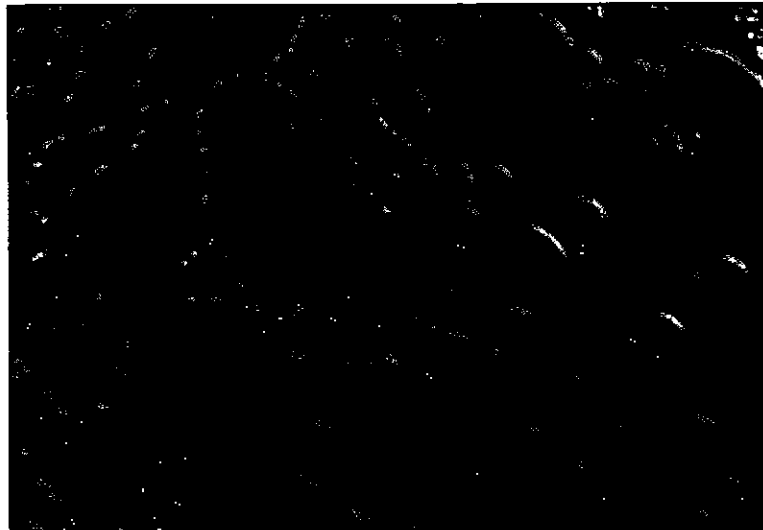


FIG. 14 Ágar BG com crescimento característico de *Salmonella*.

10.3.5.6. Ágar para enterobactérias seg. Hektoen

a) Composição:

Proteose peptonada	12,0	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Extrato de levedura	3,0	g
Sacarose	12,0	g
Lactose	12,0	g
Salicina	2,0	g
Tiosulfato de sódio	5,0	g
Citrato férrico amoniacal	1,5	g
Mistura de sais biliares	9,0	g
Azul de bromotimol	0,064	g
Fucsina ácida	0,1	g
Ágar	14,0	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,5 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Não autoclavar.

Resfriar a uma temperatura de 50-60°C.

Verter em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação: Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

b) Característica do Crescimento: as colônias de *Salmonella* são verde-azuladas com ou sem centro negro (Fig. 15).



FIG. 15 Ágar para enterobactérias seg. Hektoén com crescimento de *Salmonella*.

10.3.5.7. Ágar *Salmonella-Shigella* (Ágar SS)

a) Composição:

Extrato de carne	5,0	
Proteose-peptona	5,0	
Lactose	10,0	g
Sais biliares	8,5	g
Citrato de sódio	8,5	g
Tiosulfato de sódio	8,5	g
Citrato férrico	1,0	g
Verde brilhante	0,00033	g
Vermelho neutro	0,025	g
Ágar	13,5	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,0 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Não autoclavar.

Resfriar a $50-60^{\circ}\text{C}$ e verter em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação: Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

b) Característica do Crescimento: as colônias de *Salmonella* neste meio, são incolores, transparentes com ou sem centro negro (Fig. 16).

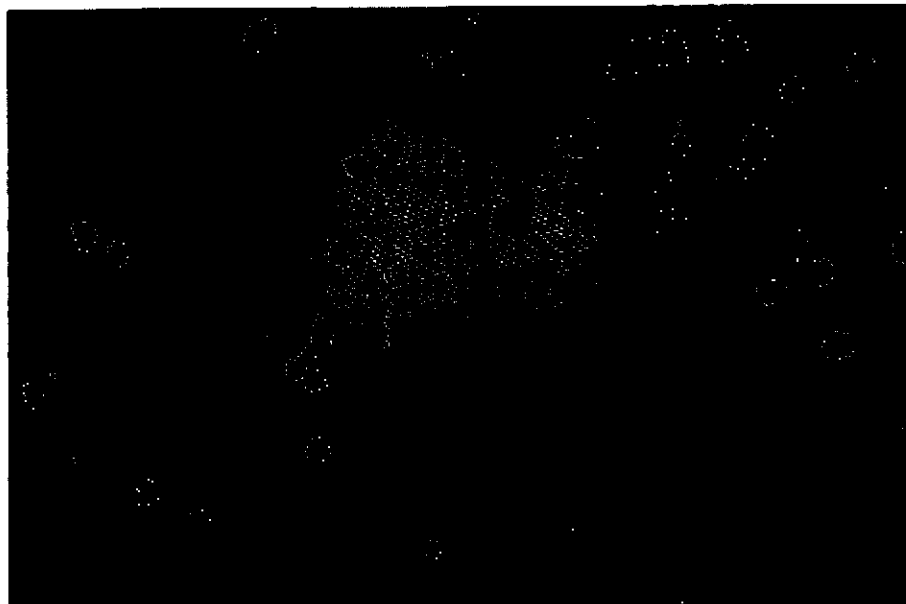


FIG 16 Ágar SS com crescimento de *Salmonella*.

10.3.5.8. Ágar xilose lisina-desoxicolato (Ágar XLD)

a) Composição:

Extrato de levedura	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
D (+) Xilose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Sacarose	7,5 g
L-Lisina	5,0 g
Desoxicolato de sódio	2,5 g
Citrato férrico amoniacal	0,8 g
Tiosulfato de sódio	6,8 g
Vermelho de fenol	0,08 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,4 \pm 0,1$.

Aquecer brevemente.

Não autoclavar.

Verter em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação: Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

- b) **Característica do Crescimento:** as salmonelas se caracterizam por crescerem neste meio com colônias da mesma cor do meio de cultura, transparentes e às vezes com o centro negro, sendo que a *Salmonella typhi* tem colônias alaranjadas, ligeiramente opacas.

10.3.5.9. Ágar Rambach

a) **Composição:**

Péptona	8,0 g
Propileno glicol	10,5 g
Desoxicolato de sódio	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Mistura cromogênica	1,5 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Adicionar um frasco-suplemento (mistura líquida) em 250 ou 100 ml de água destilada (a quantidade de água dependerá do tamanho da embalagem).

Agitar bem até que esteja totalmente dissolvida

Adicionar um frasco de pó nutriente e agitar bem até a completa dissolução.

Aquecer em banho de água fervente ou em vapor fluente, agitando cuidadosamente até que o meio de cultura esteja totalmente dissolvido.

Não autoclavar.

Resfriar o meio a 50-60°C.

Agitar bem para homogeneização antes de vertê-lo em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

O pH final deste meio deve ser $7,3 \pm 0,2$ a 25°C.

Observação: Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

- b) **Características do Crescimento:** as colônias de *Salmonella* spp., neste meio, são vermelhas, enquanto que *S.typhi* e *S.paratyphi* A, *Proteus* spp. e *Shigella* spp., apresentam-se incolores. Os coliformes desenvolvem colônias azul-verdeadas (*E.coli*, *Citrobacter*) ou violeta azuladas (*Klebsiella*) (Fig.17).



FIG. 17. Ágar Rambach com crescimento positivo de *Salmonella* spp.

10.3.5.10. Ágar três açúcares e ferro (Ágar TSI)

a) Composição:

Peptona	15,0	g
Proteose-peptona	5,0	g
Extrato de carne	3,0	g
Extrato de levedura	3,0	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Lactose	10,0	g
Sacarose	10,0	g
Glicose	1,0	g
Sulfato ferroso amônia 6. H ₂ O	0,2	g
Tiosulfato de sódio	0,2	g
Vermelho de fenol	0,024	g
Ágar	13,0	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,4 \pm 0,1$.

Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm com tampa rosqueável.

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Após a esterilização, inclinar os tubos até a solidificação total do meio, de forma que seja formado um bisel longo (5 cm) e uma base alta (3 cm).

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) Característica do Crescimento: as salmonelas apresentam as seguintes características de crescimento neste meio (Figs. 18, 19 e 20):

- produção de H_2S (enegrecimento de certa parte do meio) e gás (podem também não apresentar produção de H_2S);
- o ápice do meio se torna amarelo devido a fermentação da dextrose;
- a superfície inclinada apresenta coloração vermelha devido a não fermentação da lactose e da sacarose.

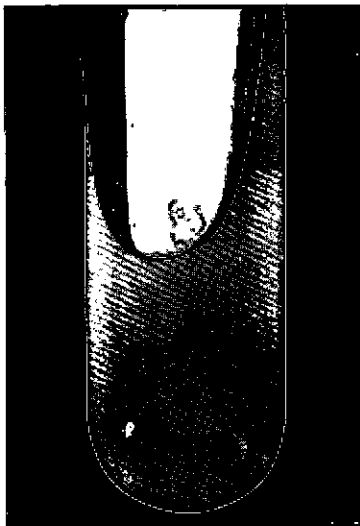


FIG. 18 Ágar TSI sem crescimento.

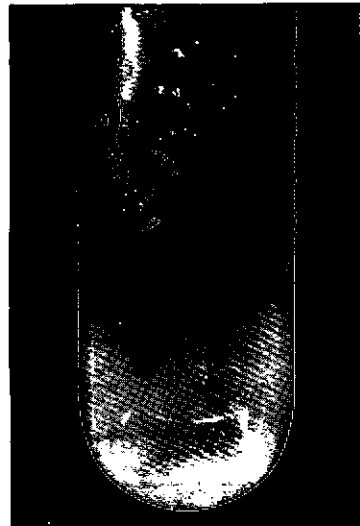


FIG. 19 Ágar TSI com crescimento característico de *Salmonella*.



FIG. 20 Ágar TSI com crescimento não característico de *Salmonella*.

10.3.5.11. Ágar lisina-ferro (LIA)

a) Composição:

Peptona de carne	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Glicose	1,0 g
L-Lisina monoclóridato	10,0 g
Tiosulfato de sódio	0,04 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $6,7 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm com tampa rosqueável.

Esterilizar em autoclave $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Após a esterilização inclinar os tubos até a solidificação total do meio, de maneira que se forme uma base de ± 3 cm e um bisel de no mínimo 3 cm.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) **Característica do crescimento:** a maioria das salmonelas crescem modificando a coloração do meio violeta e produzem H_2S (Figs.21 e 22).



FIG. 21 Ágar lisina-ferro sem crescimento.

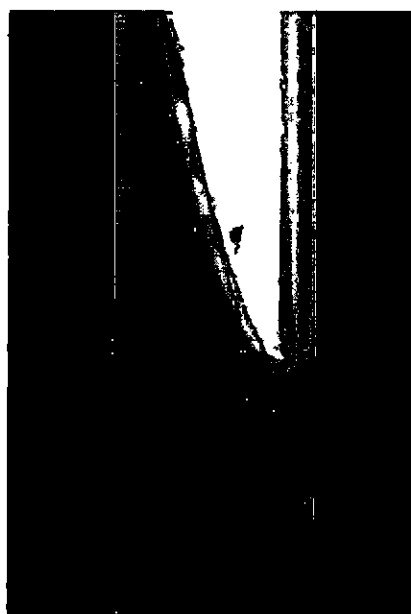


FIG. 22 Ágar lisina-ferro com crescimento positivo.

10.3.6. Metodologia e técnicas de análise

10.3.6.1. Metodologia de análise

As metodologias empregadas para detecção de *Salmonella* em alimentos utilizam basicamente as seguintes etapas:

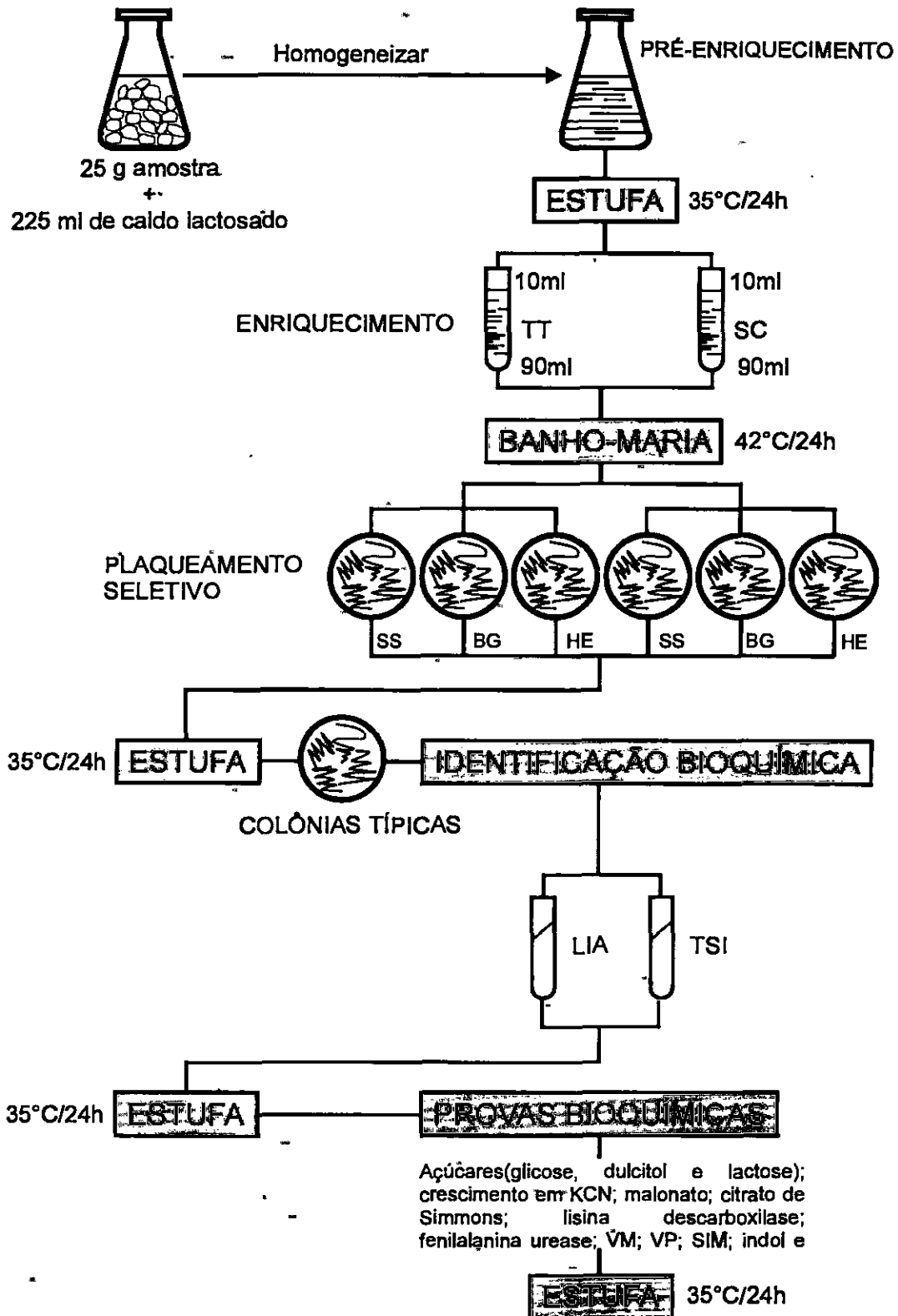
- a) **pré-enriquecimento:** utilizada para recuperar células de microrganismos injuriadas durante o processamento, bem como para aumentar o número, de maneira não seletiva, de enterobactérias. Para alimentos não processados, esta fase é dispensável;
- b) **enriquecimento seletivo:** favorece a multiplicação das salmonelas, inibindo ou restringindo o desenvolvimento de outros microrganismos presentes;

- c) **planeamento em meios seletivos-indicadores:** nesta fase deve-se utilizar pelo menos dois meios sólidos, sendo um de pequeno e outro de grande efeito inibidor da microflora acompanhante, e que forneçam indicações, das colônias suspeitas do gênero *Salmonella*;
- d) **triagem das colônias:** as colônias suspeita são testadas em meios que fornecem indicações sobre as características bioquímicas dos microrganismos, as quais servem para triagem. Os meios ágar três açúcares-ferro (ágar TSI) e ágar lisina-ferro (LIA), são freqüentemente empregados, juntamente, nesta etapa;
- e) **provas bioquímicas complementares:** para comprovação do gênero *Salmonella*;
- f) **provas sorológicas:** para caracterização sorológica do gênero *Salmonella* (soros polivalentes).

10.3.6.2. Técnica de análise (Fig. 23)

- a) **pré-enriquecimento:** retirar assepticamente 25 g ou 25 ml da amostra e adicionar 225 ml de caldo lactosado ou água peptonada tamponada. Incubar a 35-37°C/24 horas;
- b) **enriquecimento seletivo:** transferir, assepticamente, do pré-enriquecimento, alíquotas de 10 ml para 90 ml de caldo selenito-cistina e para 90 ml de caldo de enriquecimento tetrationato verde brilhante. Incubar a 42,5°C/24 horas em banho-maria;
- c) **planeamento em meio seletivo-indicador:** do enriquecimento seletivo fazer estrias, com auxílio da alça de platina, nos seguintes meios sólidos: ágar verde-brilhante, ágar XLD, ágar para enterobactérias seg. Hektoen, ágar *Salmonella-Shigella*, ágar Rambach. Incubar a 35-37°C/24 horas;
- d) **triagem das colônias:** transcorrido o período de incubação do planeamento seletivo, transferir as colônias suspeitas de *Salmonella* com auxílio de agulha de platina, fazendo estrias, no bisel e inoculação em profundidade nos meios: ágar TSI e ágar lisina-ferro. Incubar a 35-37°C/24 horas;
- e) **provas bioquímicas complementares:** com as culturas suspeitas de *Salmonella*, proceder as inoculações nos seguintes meios: (o período e a temperatura de incubação, encontram-se nas descrições de cada prova - item 10.5.).
 - caldo malonato, caldo KCN, caldo vermelho de metila-Voges-Proskauer, caldo indol, ágar citrato de SIMMONS, ágar fenilalanina, ágar lisina-descarboxilase, caldo carboidrato (glicose, lactose e dulcitol) vermelho de fenol, meio sim, ágar gelatina, caldo uréia.
- f) **interpretação das provas bioquímicas**

FIG. 23. Esquema da técnica de análise de *Salmonella*.



* As culturas de *Salmonella* sp apresentam o seguinte quadro:

Citrato de SIMMONS	+
Lisina descarboxilase	+
Fenilalanina desaminase	-
Malonato	-
Vermelho de metila	+
Voges-Proskauer	-
Indol	-
Hidrólise da gelatina	-
KCN	-
Açúcares:, lactose	-
glicose	+
dulcitol	+
Motilidade (meio sim)	+
Urease	-

10.4. Outras enterobactérias

GÊNERO	II	<i>Shigella</i>
GÊNERO	V	<i>Klebsiella</i>
GÊNERO	VI	<i>Enterobacter</i>
GÊNERO	XI	<i>Proteus</i>
GÊNERO	XIV	<i>Yersinia</i>

10.4.1. Hábítat natural

São comumente encontradas em águas residuais e correntes, com exceção dos gêneros *Shigella* e *Yersinia*.

A maioria está presente no trato intestinal do homem e animais, sendo que a *Shigella* raramente é isolada no trato intestinal de animais a não ser de primatas.

As espécies de *Klebsiella* formam parte da flora bucal, e do trato intestinal.

Proteus é encontrado em produtos de origem animal, especialmente em decomposição e em vários alimentos.

Algumas espécies de *Yersinia* são encontradas em glândulas, nódulos linfáticos e intestinos de vários animais e do homem.

10.5. Principais provas bioquímicas utilizadas para identificação de enterobactérias

10.5.1. Prova de utilização do citrato de Simmons

a) Meio de cultura: ágar citrato de Simmons

• Composição:

Difosfato de amônio	1,0 g
Monofosfato de potássio	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Citrato de sódio	2,0 g
Sulfato de magnésio	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH deste meio é $6,9 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Distribuir 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min.

Após a esterilização, inclinar os tubos até a solidificação total do meio.

Observação: Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

b) **Forma de Atuação:** esta prova bioquímica é utilizada para caracterizar microrganismos capazes de utilizar o citrato como a única fonte de carbono, os quais provocam a elevação do pH do meio de cultivo devido a metabolização de íon citrato.

c) **Resultado:** após incubação a 37°C por 4 dias, tem-se (Figs. 24 e 25):

- **positivo:** o meio se torna azul intenso, principalmente no ápice.
- **negativo:** a cor natural do meio não muda, permanecendo verde.

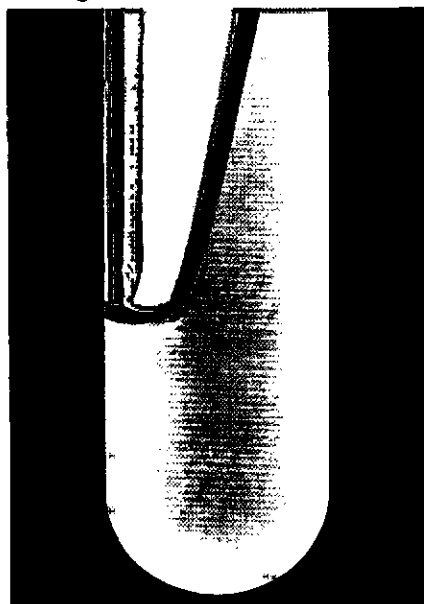


FIG. 24 Ágar citrato de Simmons sem crescimento.



FIG. 25 Ágar citrato de Simmons com crescimento positivo.

10.5.2. Prova de fenilalanina

a) Meio de cultura: ágar fenilalanina

• **Composição:**

Extrato de levedura	3,0 g
DL-Fenilalanina ou L-Fenilalanina	2,0 g
Monofosfato de sódio	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	12,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

Aquecer até a completa dissolução.

Distribuir 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Esterilizar em autoclave a 121°C / 10 min.

Após a esterilização, inclinar os tubos até a solidificação total do meio.

Observação:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.
2. Na leitura adicionar de 3 a 5 gotas de uma solução de cloreto férrico a 0,5 M (\pm 13% peso/volume).

b) **Forma de Atuação:** esta prova bioquímica é utilizada na diferenciação de microrganismos capazes de desaminar a fenilalanina em ácido fenil pirúvico, por ação enzimática.

c) **Resultado:** após incubação a 37°C por 24 horas e adição do reagente, tem-se:

- **positivo:** uma cor verde aparecerá se o ácido fenil pirúvico tiver sido formado.
- **negativo:** a cor natural do meio não muda, somente aparecerá, devido ao cloreto férrico, uma coloração amarela no ápice (Fig. 26).

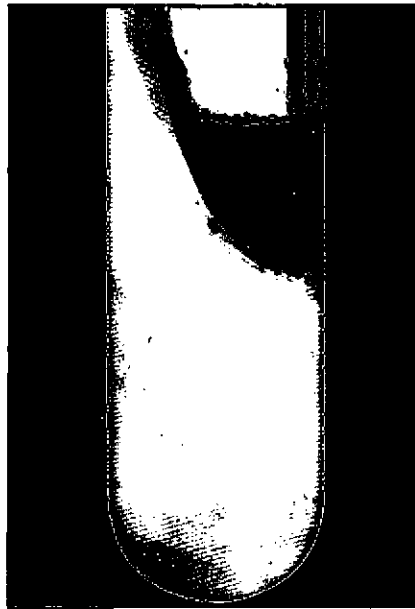


FIG. 26 Ágar fenilalanina com crescimento negativo.

10.5.3. Prova de hidrólise da gelatina

a) Meio de cultura: ágar gelatina

• Composição:

Gelatina	30,0 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Tripticase	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,2 \pm 0,2$.

Aquecer até completa dissolução.

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Após a esterilização esfriar o meio a $55-60^{\circ}\text{C}$ e verter em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação: Na leitura adicionar ácido clorídrico a 1%.

b) **Forma de Atuação:** esta prova é utilizada para diferenciação de microrganismos produtores de enzimas proteolíticas (gelatinase).

c) **Resultado:** após incubação a 37°C pelo período necessário (quando for longo deve-se utilizar tubos), tem-se:

- **positivo:** devido a ação do ácido clorídrico o meio se torna opaco, excetuando-se a zona ao redor da semeadura.
- **negativo:** o não aparecimento da zona clara ao redor da semeadura. (Fig.27).



FIG. 27 Ágar gelatina com crescimento negativo.

10.5.4. Prova de descarboxilação da lisina

a) Meio de cultivo: ágar lisina-descarboxilase

• Composição:

L - Lisina Monocloridrato	10,0 g
Peptona de carne	4,5 g
Peptona de farinha de soja	2,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Glicose	1,0 g
Tiosulfato de sódio	0,2 g
Sulfato ferroso amoniacal	0,2 g
Púrpura de bromocresol	0,032g
Ágar	6,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $5,6 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Distribuir 3 ml em tubos de 13 x 100 mm

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observação:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

2. Após a inoculação da colônia suspeita, adicionar vaselina líquida ou óleo mineral (Nujol) estéril.

b) **Forma de Atuação:** esta prova é utilizada para medir habilidade de alguns microrganismos de descarboxilarem um aminoácido para formar amina, que alcaliniza o meio.

c) **Resultado:** após incubação a 37°C por 24-48 horas, tem-se:

• Positivo:

* H_2S negativo: coloração violeta.

* H_2S positivo: enegrecimento do meio, eventualmente, com uma zona ao redor do crescimento em tom violeta (Fig. 28);

• Negativo: coloração amarela-esverdeada, sem alteração da cor do meio.



FIG. 28 Ágar lisina-descarboxilase com crescimento positivo.

10.5.5. Prova de fermentação de carboidratos e compostos correlatos

a) Meio de cultura: caldo carboidrato vermelho de fenol

• Composição:

Peptona ou Trypticase	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho de fenol	0,025 g
Carboidrato*	5,0 g
Água destilada	900 ml

* carboidrato: lactose, glicose, sacarose, dulcitol e outros

Dissolver os componentes em água destilada, exceto o carboidrato.

Ajustar meio para que o pH, após a esterilização, seja $7,0 \pm 1$.

Distribuir volumes de 9 ml em tubos de 16 x 150 mm contendo tubos de fermentação invertidos (tubos de Durham).

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min.

Esfriar à temperatura ambiente e adicionar 1 ml de uma solução aquosa a 5%, esterilizada por filtração, do carboidrato desejado.

- b) **Forma de Atuação:** esta prova é para determinar a habilidade dos microrganismos de fermentarem carboidrato específico, produzindo ácido ou ácido e gás.
- c) **Resultado:** após incubação a 37°C por até 30 dias, tem-se: (Figs. 29, 30, 31 e 32)
- **positivo:** mudança na coloração do meio de vermelho para amarelo (fermentação do carboidrato - produção de ácido) e a presença de gás nos tubos de fermentação (tubos de Durham).
 - **negativo:** não há mudança na coloração do meio.

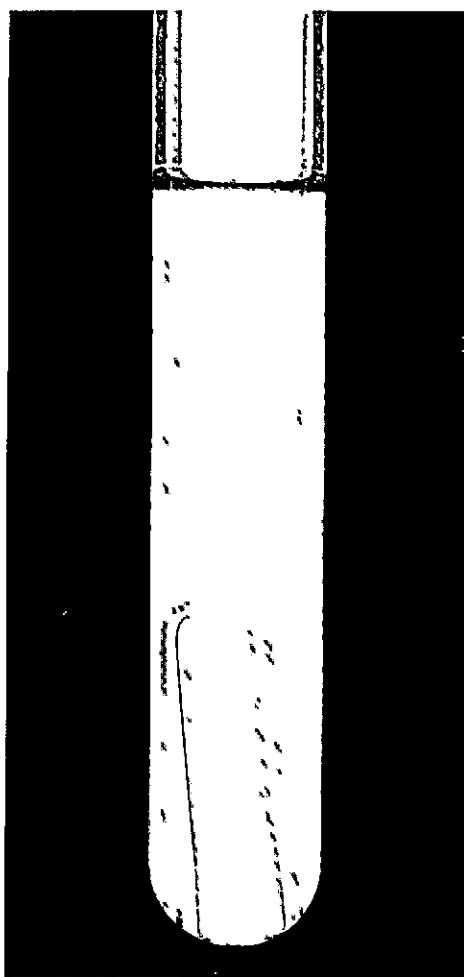


FIG. 29 Caldo carboidrato sem crescimento.

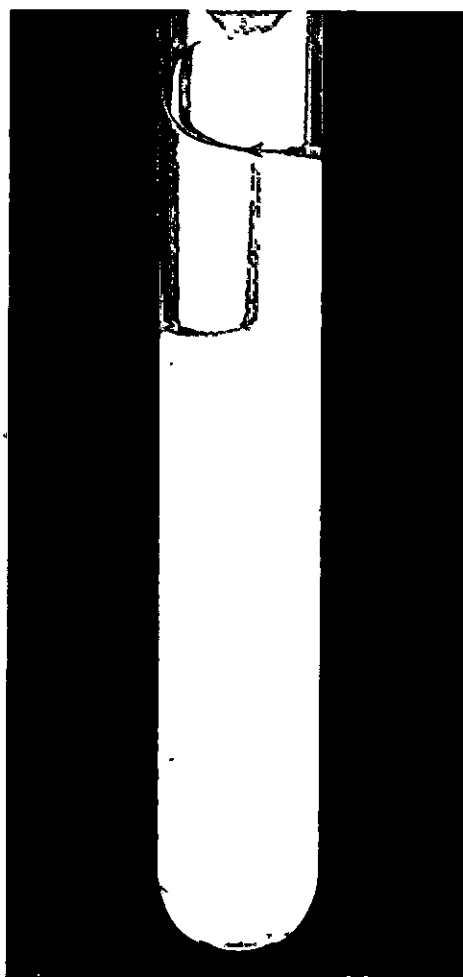


FIG. 30 Caldo carboidrato com crescimento positivo e produção de gás.



FIG. 31 Caldo carboidrato com crescimento positivo sem produção de gás.

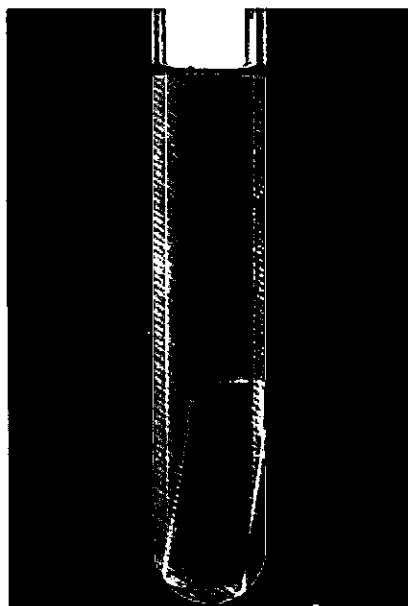


FIG. 32 Caldo carboidrato com crescimento negativo.

10.5.6. Prova de produção de indol

a) Meio de cultura: caldo de triptona

• Composição:

Triptona	10,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

O pH final deste meio deve ser $6,9 \pm 0,2$.

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observação: Na leitura adicionar de 2 a 4 gotas de reativo de Kovacs

• Reativo de Kovacs

p-Dimetilaminobenzaldeído	5,0 g
Álcool amílico	75 ml
Ácido clorídrico	25 ml

Dissolver o p-dimetilaminobenzaldeído no álcool amílico e, então, lentamente adicionar o ácido clorídrico.

b) **Forma de Atuação:** esta prova é para testar a habilidade de alguns microrganismos de degradarem a molécula de triptofano em indol.

c) **Resultado:** após incubação a 37°C/48 horas e adição do reativo, tem-se: (Figs. 33, 34 e 35)

- **positivo:** a presença de uma coloração vermelha na superfície do líquido.
- **negativo:** a presença de uma coloração amarela (cor do reativo de Kovacs) na superfície do líquido.

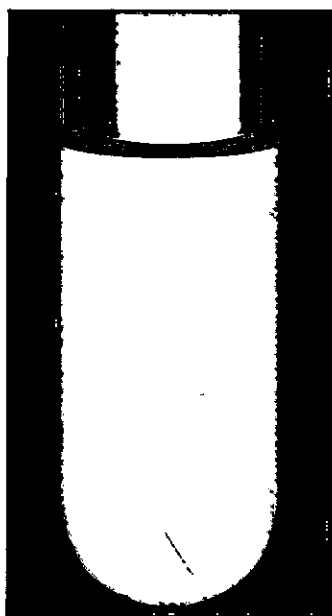


FIG. 33 Caldo indol sem crescimento.

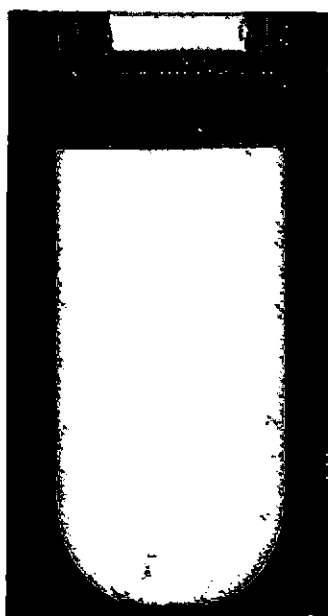


FIG. 34 Caldo indol com crescimento positivo.

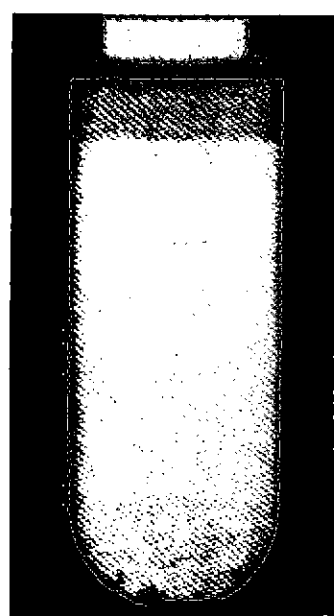


FIG. 35 Caldo indol com crescimento negativo.

10.5.7. Prova de utilização do malonato

a) Meio de cultura: caldo malonato

• **Composição:**

Extrato de levedura	1,0	g
Sulfato de amônia	2,0	g
Monofosfato de potássio	0,6	g
Difosfato de potássio	0,4	g
Cloreto de sódio	2,0	g
Glicose	0,25	g
Malonato de sódio	3,0	g
Azul de bromotimol	0,025	g
Água destilada	1000	ml.

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $6,7 \pm 0,1$.

Se necessário, aquecer para a completa dissolução.

Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) **Forma de Atuação:** esta prova é para testar a habilidade de certos microrganismos de utilizarem o malonato de sódio como a única fonte de carbono.

c) **Resultado:** após incubação a 37°C por 48 horas, tem se: (Fig. 36, 37 e 38)

- **positivo:** a coloração muda de verde para leve azul a azul da Prússia.
- **negativo:** a cor original (verde) do meio não muda.

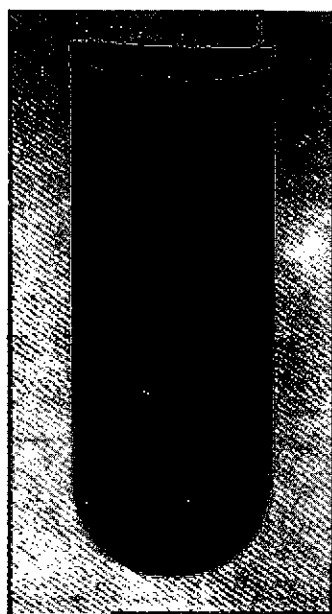


FIG. 36 Caldo malonato sem crescimento.

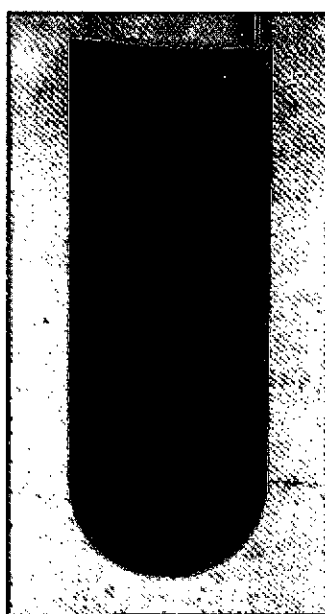


FIG. 37 Caldo malonato com crescimento positivo.

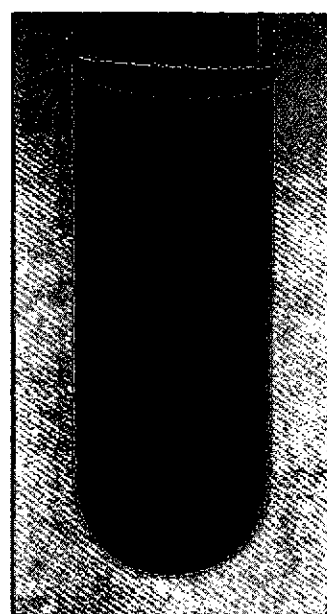


FIG. 38 Caldo malonato com crescimento negativo.

10.5.8. Prova de hidrólise da uréia

a) Meio de cultura: caldo uréia

• Composição:

Uréia	20,0	g
Extrato de levedura	0,1	g
Difosfato de potássio	0,091	g
Monofosfato de sódio	0,095	g
Vermelho de fenol	0,01	g
Água destilada	1000	ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $6,8 \pm 0,2$.

Não aquecer.

Esterilizar por filtração.

Distribuir assepticamente volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm previamente esterilizados.

b) **Forma de Atuação:** nesta prova bioquímica comprova-se a capacidade de certos microrganismos de produzirem urease, com conseqüente produção de amônia em quantidade suficiente, para elevar o pH do meio fortemente tamponado.

c) **Resultado:** após inoculação (inóculo recente e abundante) e incubação a 37°C, fazer leitura após 8, 12, 24, 48 horas, quando observa-se: (Figs. 39, 40 e 41)

- **positivo:** coloração de rosa a vermelho.
- **negativo:** coloração original (amarelo) do meio.

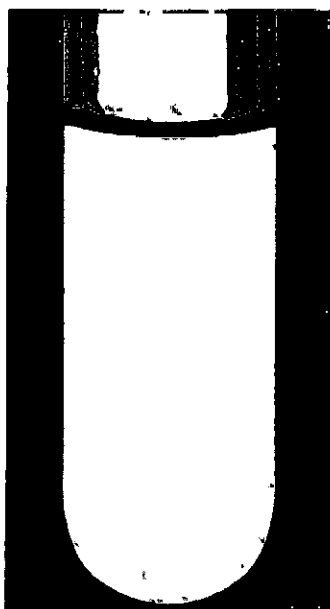


FIG. 39 Caldo uréia sem crescimento.

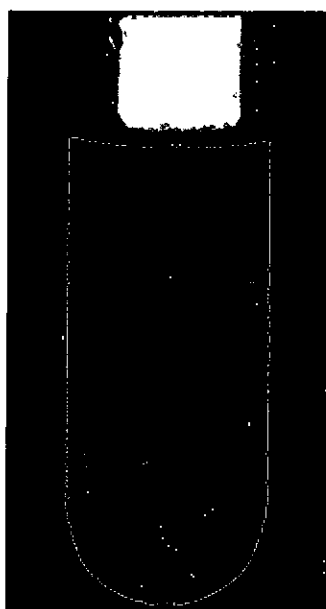


FIG. 40 Caldo uréia com crescimento positivo.

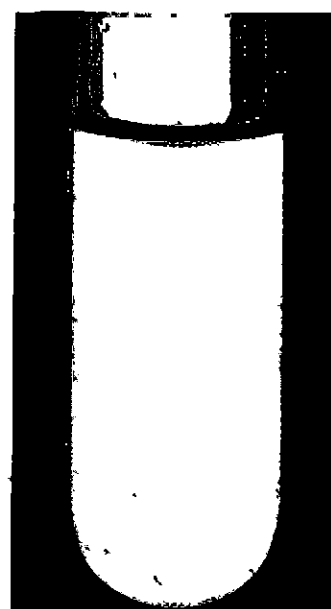


FIG. 41 Caldo uréia com crescimento negativo.

10.5.9. Prova do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)

a) Meio de cultura: caldo VM-VP (meio de Clark e Lubs)

• **Composição:**

Peptona de carne	7,0 g
Glicose	5,0 g
Monófosfato de potássio	5,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $6,9 \pm 0,1$.

Distribuir em volumes de 5 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observações:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.
2. Na leitura, transferir alíquotas de 1 ml para tubos de 13 x 100 mm previamente esterilizados.

b) **Forma de Atuação:**

- **prova do VM:** esta prova é para testar a habilidade de certos microrganismos de produzirem e manterem estáveis produtos ácidos finais da fermentação da glicose. Na leitura adicionar 5 gotas de uma solução de vermelho de metila.

* **Solução de vermelho de metila:**

Vermelho de Metila	0,10 g
Álcool 95% (etanol)	300 ml

Dissolver o vermelho de metila em 300 ml de álcool e adicionar 500 ml de água destilada.

- * **Resultado:** após incubação a 37°C por 48 horas, adicionar o reagente e interpretar:

⇒ **positivo:** coloração vermelha (Fig. 42).

⇒ **negativo:** cor original (amarela) do meio (Fig. 43).

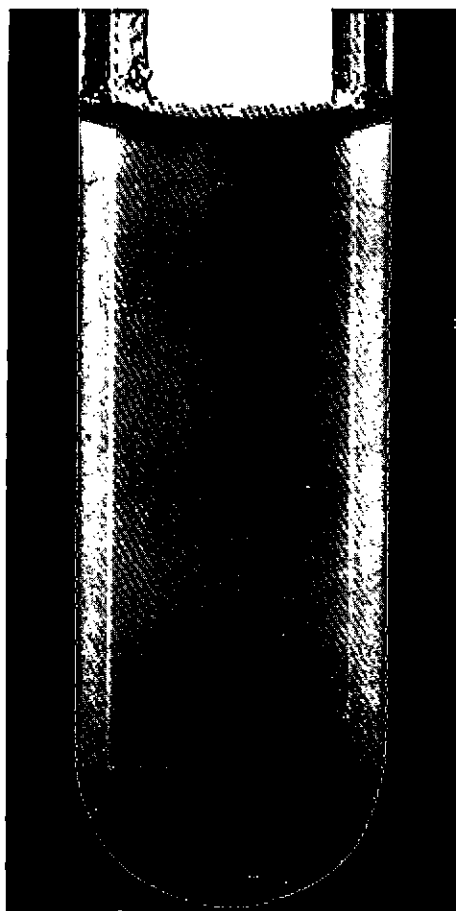


FIG. 42 Caldo VM com crescimento positivo

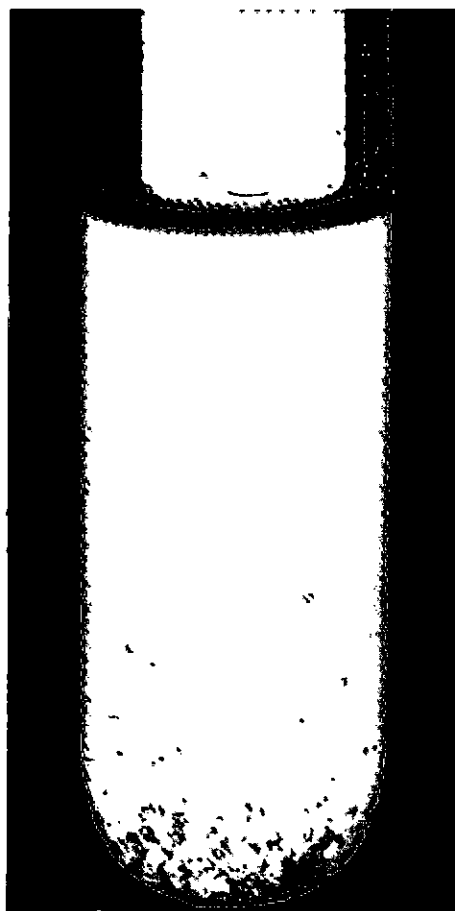


FIG. 43 Caldo VM com crescimento negativo

- **prova do VP:** esta prova é para testar a habilidade de certos microrganismos de produzirem um produto final neutro, acetilmetilcarbinol, durante a fermentação da glicose. Na leitura adicionar para 1 ml:

Solução de α -naftol*	0,6 ml
Solução de hidróxido de potássio a 40%	0,2 ml

agitar e esperar até duas horas

* Solução de α -naftol

α - Naftol	5,0 g
Álcool absoluto	100 ml

- * **Resultado:** para cada ml da cultura incubada durante 48 horas, adicionar os reagentes, agitando sempre após a inclusão de cada solução, deixar em repouso por 5 a 30 minutos, e ter:

- ⇒ **positivo:** desenvolvimento de uma coloração rósea a vermelho rubro (Fig. 44).
- ⇒ **negativo:** ausência de coloração rósea ou vermelha (Fig. 45).

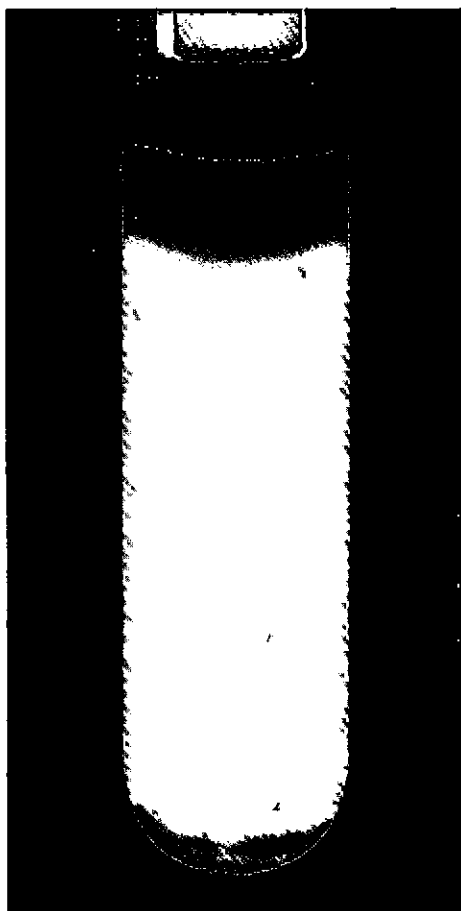


FIG. 44. Caldo VP com crescimento positivo.

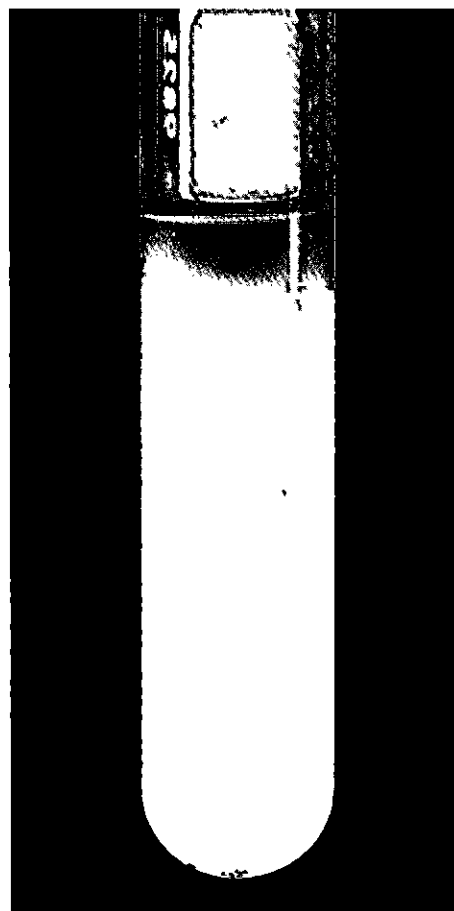


FIG. 45. Caldo VP com crescimento negativo.

10.5.10. Prova de H₂S, indol e motilidade

a) Meio de cultura: meio SIM

• Composição:

Peptona de caseína	20,0 g
Peptona de carne	6,6 g
Citrato férrico amoniacal	0,2 g
Tiosulfato de sódio	0,25 g
Ágar	3,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,3 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Distribuir em volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Esterilizar em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observação: Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

- b) **Forma de Atuação:** este meio é para verificar a motilidade dos microrganismos, a capacidade de produção de H_2S e de indol. Para isto a inoculação deve ser feita com agulha de níquel-cromo, procedendo-se uma picada no centro da coluna.
- c) **Resultado:** após incubação a 37°C por 24 a 48 horas, interpreta-se como positivo (Figs. 46 e 47):

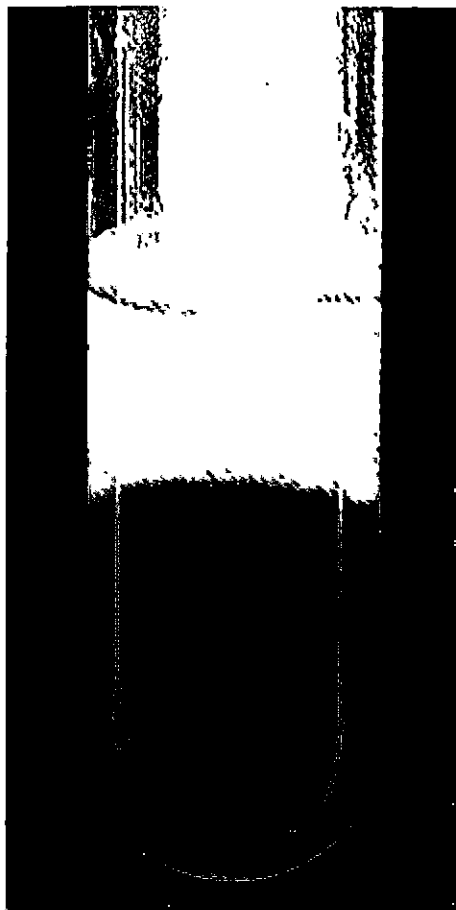


FIG. 46 Meio SIM motilidade positiva e produção de H_2S .

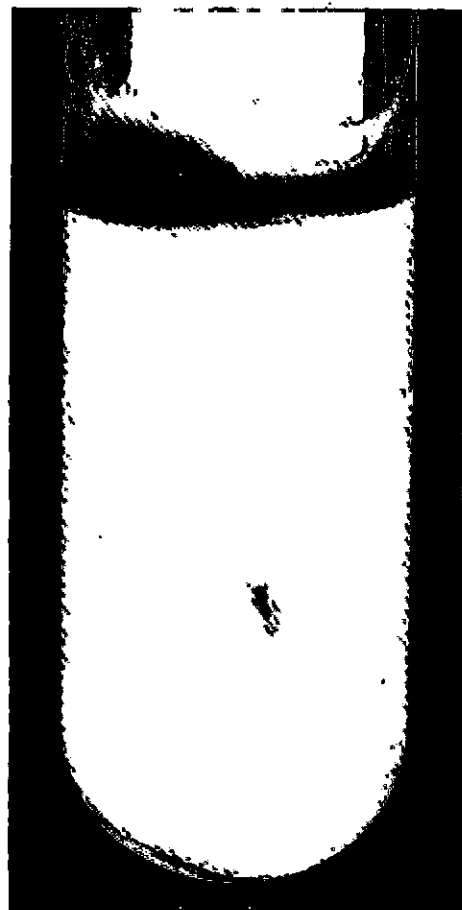


FIG. 47 Meio SIM motilidade negativa e sem produção de H_2S .

- **motilidade:** quando os microrganismos migram da linha de inoculação, difundindo-se por todo o meio, causando a turvação do mesmo;
- **produção H₂S:** quando há escurecimento do meio ao nível da sementeira.
- **produção de indol:** quando há desenvolvimento de coloração vermelha após adição de 2 a 4 gotas do reativo Kovacs, sobre a superfície do meio (ver prova de produção de indol).

10.5.11. Prova de crescimento em KCN

a) Meio de cultura: caldo KCN (base) seg. Moller

• **Composição:**

Proteose-peptona	3,0	g
Difosfato de potássio	0,225	g
Difosfato de sódio	5,640	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Água destilada	1000	ml
* aditivo: cianeto de potássio	0,076	g

Dissolver os componentes (exceto o cianeto de potássio) em água destilada.

Esterilizar em autoclave a 121°C/ 15 min.

Após esterilização, adicionar 15 ml/litro de uma solução estéril de cianeto de potássio a 0,5%.

Distribuir em volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm previamente esterilizados e fechá-los hermeticamente.

Observações:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.

2. A solução de cianeto de potássio à 0,5% deverá ser esterilizada por membrana filtrante.

b) **Forma de Atuação:** esta prova é para testar a habilidade de alguns microrganismos se multiplicarem num meio contendo cianeto de potássio.

c) **Resultado:** após incubação a 37°C por 24 a 48 horas, interpreta-se como:

- **positivo:** turvação do meio.
- **negativo:** não turvação do meio.

11. *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)

11.1. Identificação

Segundo o Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey's de 1984:

Seção 12 - Cocos Gram positivos

FAMÍLIA I - *Micrococcaceae*

GÊNERO IV	<i>Staphylococcus</i>
ESPÉCIE	<i>Staphylococcus aureus</i>

11.2. Características básicas

- bactéria Gram positiva
- cocos, agrupados em forma de um cacho de uva
- esporulado
- imóvel
- produtor de toxina (algumas cepas)
- patogênico
- anaeróbio facultativo, mas cresce melhor em condições aeróbias
- faixa de pH para crescimento 4,2-9,3 (ótimo entre 7,0 e 7,5)
- faixa de temperatura para crescimento entre 6,5 e 45°C (ótima entre 30 e 37°C)
- atividade de água mínima - 0,86

11.3. Hábitat natural

Cavidades nasais, garganta e trato intestinal

11.4. Alimentos propícios

Produtos de origem animal industrializados, carnes, ovos, leite, pescado, massas alimentícias, cremes, maionese, doces de confeitaria com ou sem recheio.

11.4.1. Significado nos alimentos

A presença de *S.aureus* nos alimentos é interpretada, em geral, como indicativo de contaminação a partir da pele, boca, e das fossas nasais dos manipuladores de alimentos, bem como da limpeza e da sanificação inadequada dos materiais e dos equipamentos.

11.5. Intoxicação por *S.aureus*

11.5.1. Toxina

São proteínas simples, facilmente solúveis em água e em soluções salinas, resistentes a ação de enzimas e termorresistentes. Nos alimentos não são totalmente inativadas pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos correntes.

Observação: Calcula-se que, para produzir intoxicação no homem, seja necessário de 0,015 a 0,357 μg de enterotoxina por Kg de peso corporal.

11.5.2. Sintomatologia

- a) período de incubação: geralmente de 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado.
- b) sintomas: náuseas, vômitos, diarreia, contrações abdominais, cefaléia.
- c) duração: 1 a 2 dias.

11.6. Meios de cultura

11.6.1. Ágar Baird-Parker

a) Composição:

- meio basal

Triptona	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Piruvato de sódio	10,0 g
Glicina	12,0 g
Cloreto de lítio hexaidratado	5,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	950 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser 6,8 a 7,2.

Aquecer até a completa dissolução.

Distribuir em frascos em volumes de 95 ml.

Autoclavar a 121°C/15 min.

• **meio completo**

* Adicionar para cada 95 ml do meio basal:

⇒ Emulsão de gema de ovo	5	ml
⇒ Solução de telurito de potássio a 1%	1	ml

Verter em placas de Petri (100 x 15 mm)

Observações:

1. Na forma desidratada proceder conforme instruções do fabricante.
2. O meio completo tem durabilidade de 48 horas e deve ser estocado na geladeira.

* **Preparação da emulsão de gema de ovo:**

⇒ ovos frescos de galinha devem ser lavados e imersos por algum tempo (não menos que três minutos), em álcool à 70%. Posteriormente flambar os ovos, abrir e separar as claras das gemas, assepticamente. Adicionar para cada 50 ml de gema, 50 ml de solução salina à 0,85%, estéril.

* **Preparação de solução de telurito de potássio:**

⇒ preparar uma solução de telurito de potássio a 1% e esterilizar por filtração.

b) **Características do Crescimento:** colônia negras, lustrosas, convexas, 1 a 5 mm de diâmetro, rodeados por halo claro de 2 a 5 mm de largura. A formação de colônias negras circundadas por um halo é devido a redução do telurito a telúrio, e a lipólise e proteólise da gema, respectivamente (Fig.48).

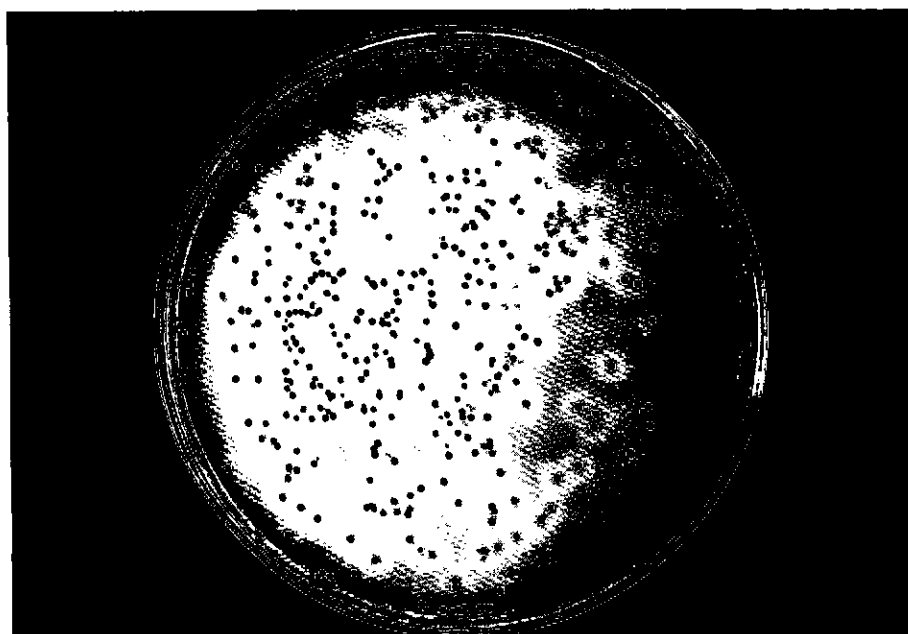


FIG. 48 Ágar Baird-Parker com crescimento característico de *S. aureus*.

11.6.2. Ágar Vogel-Johnson

a) Composição:

• meio basal

Tripticase ou triptose	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
D-Manitol	10,0 g
Monofosfato de potássio	5,0 g
Cloreto de lítio hexaidratado	5,0 g
Glicina	10,0 g
Vermelho de fenol	0,025 g
Ágar	16,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,2 \pm 0,2$.

Aquecer até a completa dissolução, com agitação freqüente.

Distribuir em frascos volumes de 98 ml.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

• meio completo

* Adicionar para cada 98 ml do meio basal:

- ⇒ solução de telurito de potássio à 1% (esterilizada por filtração) - 2 ml
- ⇒ Verter em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) Características do Crescimento: colônias negras (redução do telurito), pequenas e com halo amarelo (produção de ácido a partir do manitol -viragem a amarelo sofrido pelo de vermelho de fenol) (Fig. 49 e 50).

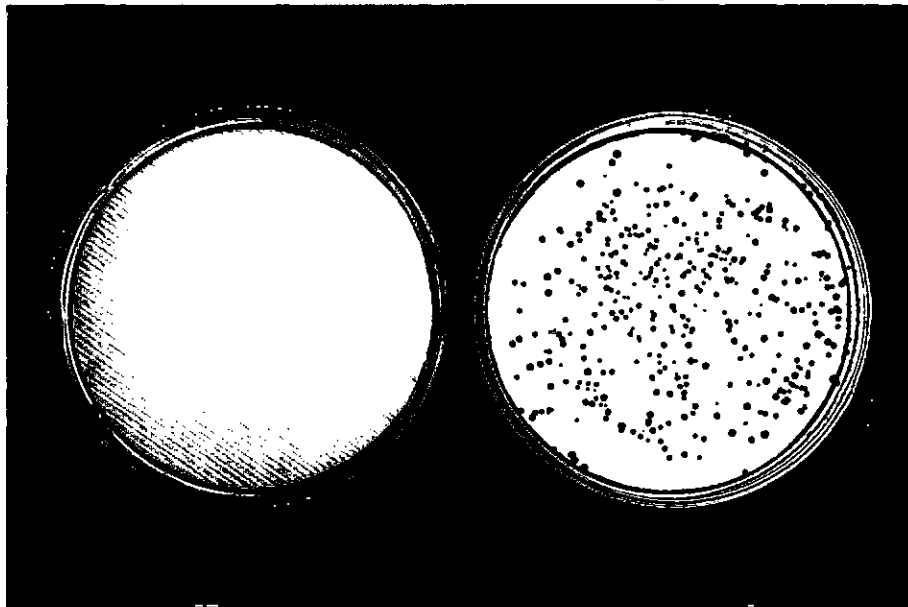


FIG. 49 Agar Vogel-Johnson sem crescimento (placa à esquerda)- Agar Vogel-Johnson com crescimento de *S.aureus* (placa à direita)



FIG. 50 Agar Vogel-Johnson com crescimento característico de *S.aureus*

11.6.3. Ágar Chapman - meio para *Staphylococcus* número 110

a) Composição:

Extrato de levedura	2,5 g
Triptona	10,0 g
Gelatina	30,0 g
Lactose	2,0 g
Manitol	10,0 g
Cloreto de sódio	75,0 g
Monofosfato de potássio	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,0 \pm 0,2$.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Esfriar a 50°C e verter em placas de Petri esterilizadas (100 x 15 mm).

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

- b) **Características do Crescimento:** neste meio crescem somente microrganismos que possuam elevada tolerância ao NaCl. Entre estes, os *S.aureus* são diferenciados através de critérios tais como a degradação do manitol, produção de gelatinase, e formação de pigmento amarelo dourado (as não pigmentadas são brancas) (Fig. 51).

A degradação do manitol é verificado pela viragem do azul de bromotimol a amarelo, após a adição de gotas de solução 0,04% sobre as colônias.

A produção de gelatinase, é verificada pelo desenvolvimento de uma zona clara ao redor das colônias, cerca de 10 min., após a adição de gotas de solução saturada de sulfato de amônia sobre as colônias, ou de uma solução a 20% de ácido sulfossalicílico.

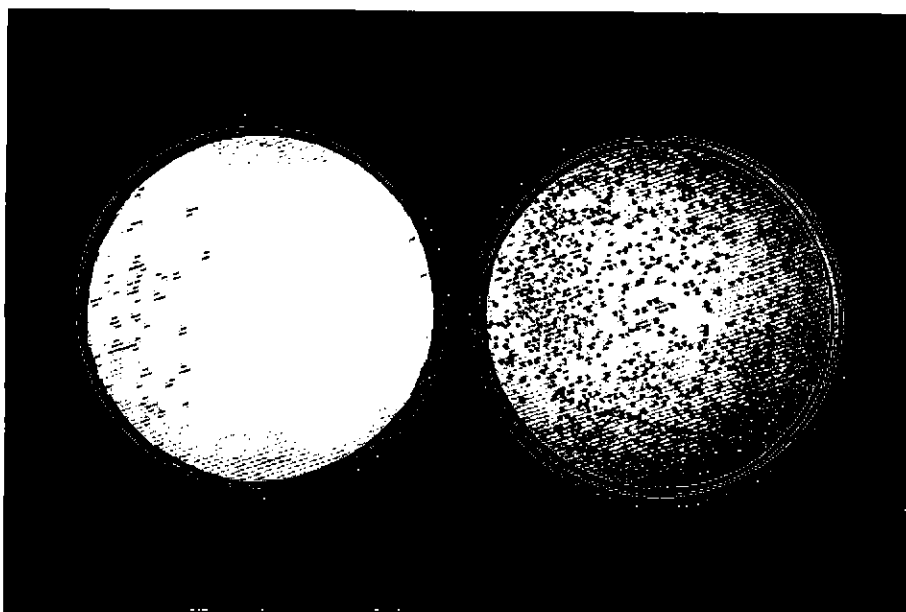


FIG. 51 Ágar Chapman sem crescimento (placa à esquerda) - Ágar Chapman com crescimento característico de *S.aureus* (placa à direita).

11.7. Provas bioquímicas

11.7.1. Meio de enriquecimento: caldo de infusão de cérebro e coração (caldo B.H.I.)

a) Composição:

Infusão de cérebro de boi	200,0 g
Infusão de coração de boi	250,0 g
Peptona ou proteose-peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Monofosfato de sódio	2,5 g
Glicose	2,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,4 \pm 0,2$.

Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) Utilização: este é um meio de enriquecimento devido as suas qualidades nutritivas.

11.7.2. Prova de DNase termorresistente

a) Meio de cultura: ágar azul de toluidina-DNA (Ágar TBD)

• Composição:

DNA	0,3 g
Cloreto de sódio	10,0 g
TRIS (Hidroximetil amino metano)	6,1 g
Solução de azul de orto-toluidina a 0,1 M	3,0 ml
Solução de cloreto de cálcio 0,01 M	1,0 ml
Ágar	10,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver o TRIS em água destilada e acertar o pH para 9,0.

Adicionar os demais componentes, exceto o azul de orto-toluidina.

Aquecer até a completa dissolução.

Adicionar o azul de orto-toluidina.

Distribuir em frascos em pequenas quantidades (50-100 ml).

Não autoclavar.

Espalhar \pm 3 ml na superfície de uma lâmina de microscópio.

Após a solidificação, perfurar o ágar (2 mm de diâmetro) e remover o ágar, da cavidade por sucção.

O teste pode ser feito também em placas de Petri.

Colocar as lâminas em câmaras úmidas.

b) **Forma de Atuação:** é para testar a capacidade de certos microrganismos de produzirem DNase. Esta nuclease é uma das características marcante para a identificação de *S.aureus*. Embora haja vários microrganismos produtores desta nuclease, a estabilidade da enzima produzida pelo *S.aureus* é excepcional, uma vez que, esta não perde a atividade quando submetida a ebulição por 30 minutos.

c) **Resultado (Fig.52):**

- **positivo:** o aparecimento de um halo rosa ao redor do orifício inoculado indica a presença da nuclease.
- **negativo:** a ausência deste halo.

11.7.3. Prova da coagulase - plasma de coelho

Utiliza-se nesta prova o plasma de coelho, o cultivo de 18-24 horas em caldo B.H.I., da cepa a ser testada.

a) **Forma de Atuação:** é para verificar a capacidade de certos microrganismos de coagularem o plasma (produção de coagulase).

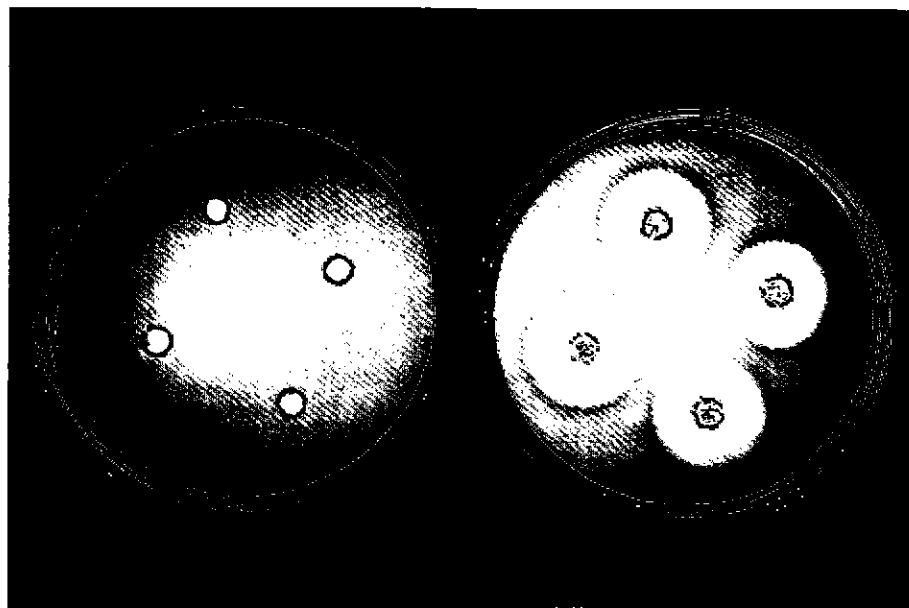


FIG. 52 Ágar azul de toluidina-DNA sem crescimento (placa à esquerda) e com crescimento positivo (placa à direita).

b) Resultado:

• positivo (Fig. 53):

pequenos coágulos desorganizados	+
pequenos coágulos organizados	++
grandes coágulos organizados	+++
conteúdo do tubo inteiramente coagulado	++++

• negativo: nenhuma evidência de formação de coágulo.

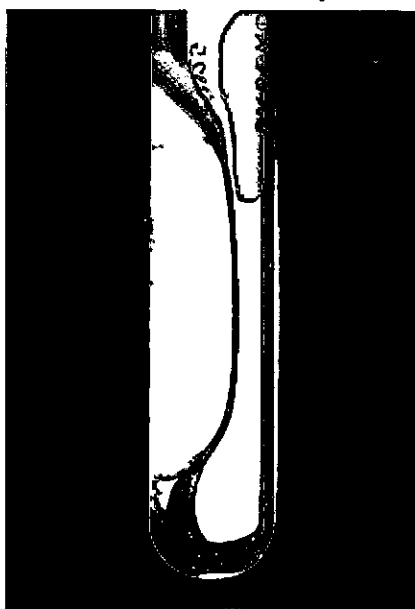


FIG. 53 Tubo com coagulase positiva.

11.7.4. Prova de catalase

Utiliza-se nesta prova água oxigenada (peróxido de hidrogênio) e caldo B.H.I.

a) **Forma de Atuação:** a catalase desdobra a H_2O_2 em $H_2O + 1/2 O_2$, que se desprende formando borbulhas.

b) **Resultado:**

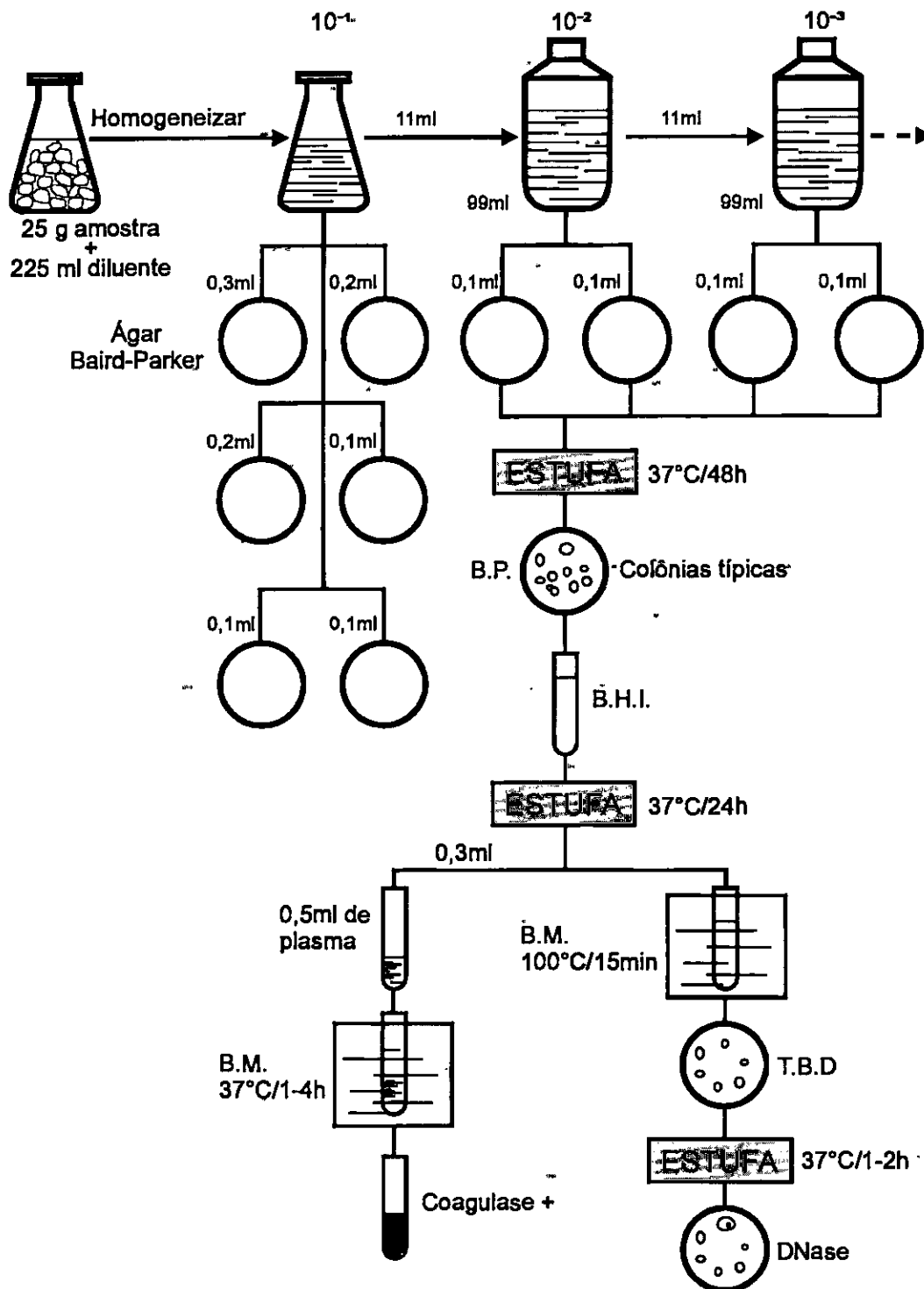
- **positivo:** presença de borbulhamento
- **negativo:** ausência de borbulhamento

11.8. Metodologia e técnicas de análise

11.8.1. Técnica de análises (Fig. 54)

- a) retirar assepticamente 25 g ou 25 ml, e preparar diluições sucessivas conforme descrito no item 4.3.;
- b) retirar de cada diluição, alíquotas de 0,1 ml e colocá-las num dos meios de cultura descritos, fazendo placas em duplicata;
- c) fazer o espalhamento do inóculo na placa com auxílio da alça de Drigalsky;
- d) incubar, invertendo as placas, a 35-37°C/48 horas;
- e) transcorrido este tempo, transferir um número representativo de colônias típicas, para caldo B.H.I. (um tubo para cada colônia);
- f) incubar a 35-37°C/24 horas;
- g) transcorrido este tempo, comprovar bioquimicamente, utilizando-se dos seguintes testes: DNase, coagulase, catalase.

FIG. 54. Esquema da técnica de análise de *S.aureus*.



11.8.1.1. Provas bioquímicas

- a) **DNAse**: transferir o tubo com crescimento em caldo B.H.I., para banho-maria a 100°C, mantendo por 15 minutos. Transferir uma alçada para o orifício do ágar azul de toluidina-DNA. Incubar a 35-37°C/ 1-4 horas;
- b) **coagulase**: após o crescimento nos tubos de caldo B.H.I., transferir alíquotas de 0,3 ml para tubos de 13 x 100 mm, previamente esterilizados. Adicionar para cada 0,3 ml do inóculo, 0,5 ml de plasma de coelho, misturar bem e incubar em banho-maria a 35-37°C. Examinar periodicamente durante 6 horas;
- c) **catalase**: após o crescimento das colônias suspeitas em caldo B.H.I., colocar uma gotícula deste inóculo numa lâmina de microscópio e gotejar água oxigenada. Observar o desprendimento de bolhas.

11.8.1.2. Interpretação das provas bioquímicas

- Características de *S.aureus*

DNAse	=	+	
Coagulase	=	+	(a maioria das estirpes)
Catalase	=	+	

12. *Bacillus cereus* (*B. cereus*)

12.1. Identificação

Segundo o Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey's de 1984:

Seção 13 - Bastonetes e Cocos formadores de esporos

FAMÍLIA: *Bacillaceae*

GÊNERO	I	-	<i>Bacillus</i>
ESPÉCIE		-	<i>Bacillus cereus</i>

12.2. Características básicas

- bactéria Gram positiva
- bastonetes longos
- esporulado
- motilidade variada
- produtor de toxina
- aeróbio facultativo
- faixa de pH para crescimento entre 4,9 e 9,3
- faixa de temperatura para crescimento entre 10 e 40°C (ótima 30°C)
- atividade de água mínima - entre 0,92 e 0,95

12.3. Hábitat natural

Solo, poeira e água.

12.4. Alimentos propícios

Produtos cárneos, vegetais, sopas, desidratados, massas alimentícias, cereais e produtos de cereais, sobremesas (pudins, sagú, etc.).

12.4.1. Significado nos alimentos

Pode indicar contaminação de matérias-primas, bem como condições inadequadas de conservação, com relação a temperatura.

12.5. Intoxicação por *B.cereus*

12.5.1. Toxina

A patogenicidade do *B.cereus* é, aparentemente, devido a uma enterotoxina, embora três fatores extracelulares sejam produzidos pela bactéria (fosfolipase, hemolisina e uma toxina letal a ratos), e também possam estar associados a toxinfecção.

12.5.2. Sintomatologia

- a) forma clássica: caracteriza-se por:
- período de incubação: 10-13 horas
 - sintomas: dores abdominais, diarreia intensa, náuseas moderadas e raramente com vômito, assemelhando-se a intoxicação pelo *C.perfringens*
- b) segunda forma: caracteriza-se por:
- período de incubação: 1 a 5 horas
 - sintomas: quadro clínico de gastroenterite aguda no qual o vômito e a diarreia são intensos, assemelhando-se a intoxicação estafilocócica.

12.6. Meios de cultura

12.6.1. Ágar base seletivo para *B.cereus* seg. Mossel

a) Composição:

Peptona de carne	10,0 g
Extrato de carne	1,0 g
Mãnilol	10,0 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Vermelho de fenol	0,025 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	900 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,1 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

• meio completo

Emulsão de gema de ovo à 50%	100 ml
Solução de sulfato de polimixina B à 1%	- 2,0 ml

Esfriar o meio basal a $50-60^{\circ}\text{C}$

Adicionar a emulsão de ovo e a solução de sulfato de polimixina B.

Verter em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação:

1. Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.
2. Emulsão de ovo (vide preparação no item 11.6.1.).
3. Solução de sulfato de polimixina B a 1% esterilizada por filtração.
4. O meio composto tem a durabilidade no máximo de 48 horas e deverá ser estocado em geladeira.

b) **Característica do Crescimento:** neste meio o *B.cereus* apresenta colônias rugosas, secas e com uma coloração rosada até púrpura, rodeadas por um halo branco (Fig. 55).



FIG. 55 Ágar seletivo para *B. cereus* seg. Mossel com crescimento característico.

12.7. Provas bioquímicas

12.7.1. Prova de fermentação de carboidratos e compostos correlatos

(Vide preparação nas Provas Bioquímicas das Enterobactérias - item 10.5.5)
Utilizar os seguintes carboidratos:

- glicose, sacarose, glicerol e salicina.

12.7.2. Prova de redução do nitrato

a) Meio de cultura: caldo nitrato

- Composição:

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Nitrato de potássio	1,0 g
Ágar	1,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser 7,0.

Aquecer até a completa dissolução com freqüente agitação.

Distribuir em volumes de 5 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Autoclavar a 121°C/15 min.

Observação:

1. Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.
2. Após 48 horas de sua preparação, antes de utilizá-lo, ferver por 2 minutos.
3. Na leitura adicionar gotas de reativo para o nitrato.

• **Reativo para o Nitrato**

* **Solução A: Solução de ácido sulfanílico**

Ácido sulfanílico	1,0	g
Ácido acético	125	ml

* **Solução B: Solução de α -naftol**

α -Naftol	0,5	g
Ácido acético	100	ml

b) **Forma de Atuação:** esta prova bioquímica é para testar a habilidade de certos microrganismos reduzirem o nitrato a nitrito.

c) **Resultado:**

- **positivo:** o aparecimento de uma coloração rosa a vermelho, indica a presença de nitrito (Fig. 56).
- **negativo:** a cor original não muda.



FIG. 56 Caldo nitrato com crescimento positivo.

12.7.3. Prova de hidrólise do amido

a) Meio de cultura: ágar amido

• Composição:

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Amido solúvel	2,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver o componentes em água destilada exceto o amido.

O pH deste meio é $7,2 \pm 0,1$.

Aquecer até a completa dissolução.

Adicionar, neste momento, pouco a pouco o amido, agitando vigorosamente.

Ferver durante 3-4 minutos.

Autoclavar a 121°C/15 min.

Resfriar a 50-60°C e verter em placas de Petri: (100 x 15 mm) esterilizadas.

Observação: Na leitura adicionar gotas de lugol

- Solução de lugol

Iodo	1,0 g
Iodeto de potássio	2,0 g
Água destilada	300 ml

b) **Forma de Atuação:** esta prova bioquímica é para testar a capacidade de certos microrganismos hidrolizarem o amido.

O amido é corado de azul pelo iodo, mas quando hidrolizado, seus produtos de degradação (dextrinas, maltose e glicose) não produzem mais esta reação.

c) **Resultado:**

- **positivo:** presença de zonas claras ao redor do inoculado, não coradas pelo iodo (Fig. 57).
- **negativo:** a ausência destas zonas claras, ficando todo corado pelo iodo.



FIG. 57 Ágar amido com crescimento positivo.

12.7.4. Prova de reações metabólicas

a) Meio de cultura: leite tornassolado

• **Composição:**

Leite desnatado em pó	100,0 g
Tornassol	5,0 g
Água destilada	1000 ml

Colocar os componentes num Becher de 2.000 ml e adicionar lentamente a água destilada, agitando sempre.

O pH final deste meio deve ser 6,8.

Filtrar em algodão e distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Autoclavar a 121°C/5 min.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) **Forma de Atuação:** esta prova é utilizada para diferenciar microrganismos com base nas suas múltiplas reações metabólicas em meio de leite. Observa-se a ação sobre a caseína (peptonização), a fermentação da lactose (que pode provocar coagulação) e produção de gás.

c) **Resultado:**

- **positivo:** peptonização, com conseqüente formação de zona transparente na superfície do meio (Fig. 58).

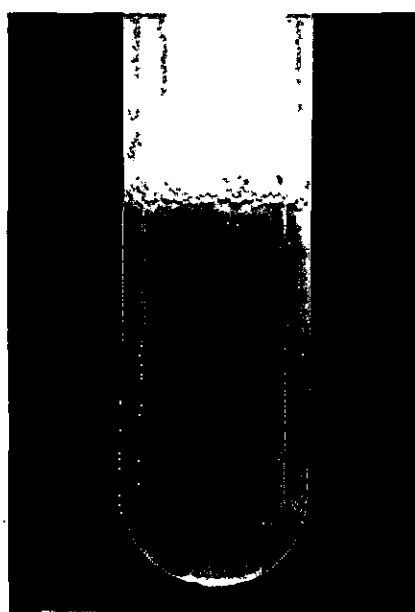


FIG. 58 Leite tornassolado com crescimento positivo.

12.7.5. Prova do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)

(Vide preparação nas Provas Bioquímicas das Enterobactérias - item 10.5.9)

12.7.6. Prova de hidrólise da gelatina

(Vide preparação nas Provas Bioquímicas das Enterobactérias - item 10.5.3.)

12.8. Metodologia e técnicas de análise

12.8.1. Técnica de análise (Fig. 59)

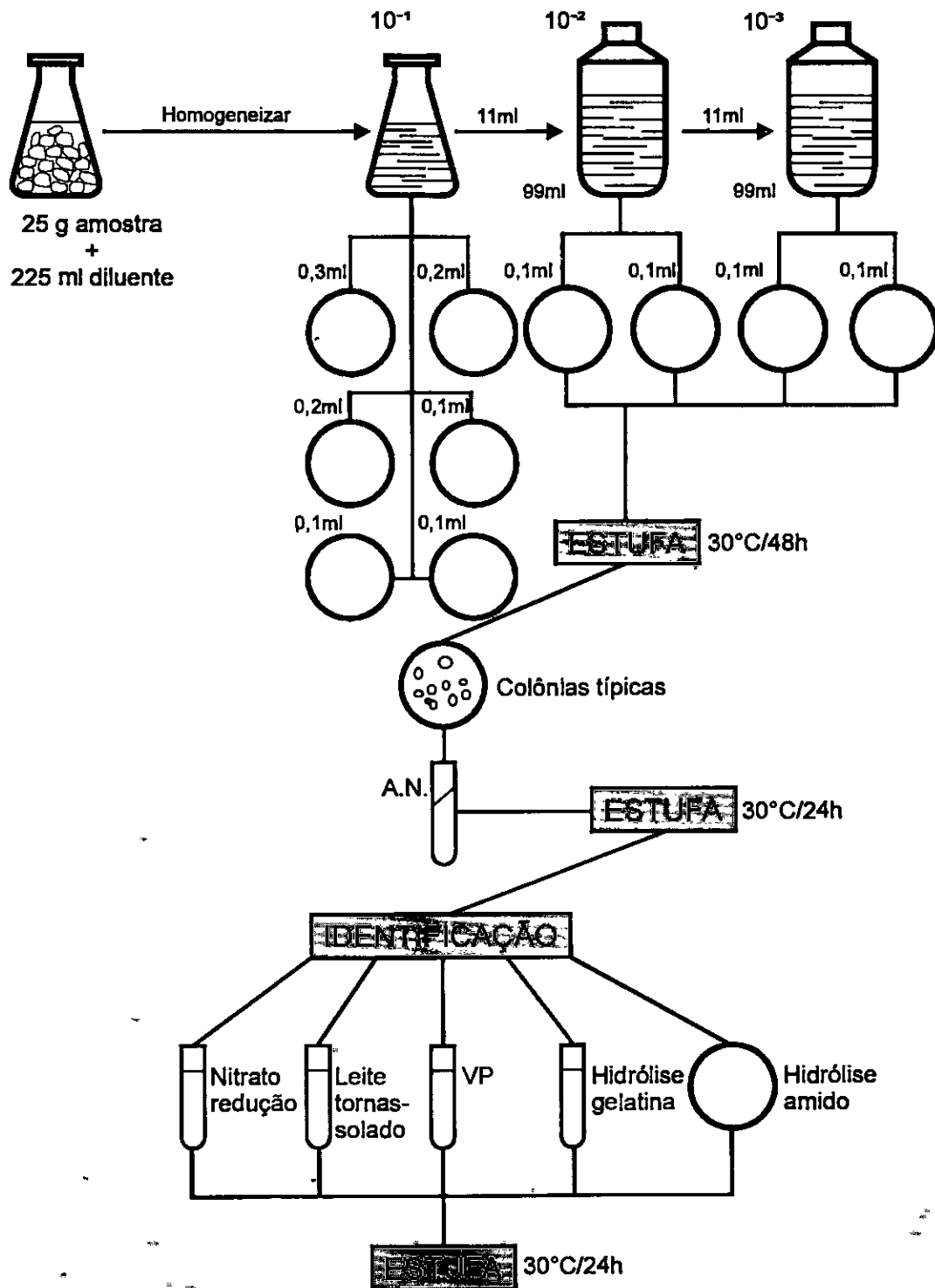
- a) retirar assepticamente 25 g ou 25 ml e preparar as diluições sucessivas conforme descrito no item 4.3;
- b) pipetar, de cada diluição, alíquotas de 0,1 ml e colocar nas placas contendo o meio ágar seletivo para *B.cereus* seg. Mossel;
- c) espalhar o inóculo com alça de Drigalsky;
- d) incubar as placas em posição invertida a 30°C/24-45 horas;
- e) transcorrido este tempo, contar as colônias típicas de *B.cereus*, e transferir algumas destas colônias, retirando-se aleatoriamente, para ágar nutriente inclinado;
- f) incubar a 30°C/24 horas;
- g) transcorrido este tempo, realizar as seguintes provas bioquímicas:
 - caldo carboidrato vermelho de fenol, caldo nitrato, ágar amido, ágar gelatina, leite tornassolado, caldo VM-VP;
- h) incubar a 30°C/24 horas, com exceção para o caldo VP que deverá ter uma incubação de 48 horas.

12.8.1.1. Interpretação das provas bioquímicas

- a) Características de *B.cereus*:

fermentação dos carboidratos sem produção de gás	
redução do nitrato a nitrito	+
hidrólise do amido	+
hidrólise da gelatina	+
rápida de peptonização do leite, sem ou com uma débil coagulação	
produção de acetilmetilcarbinol	+

FIG. 59. Esquema da técnica de análise de *Bacillus cereus*



13. *Clostridium perfringens* (C.perfringens)

13.1. Identificação

Segundo o Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey's de 1984:

Seção 13 - Bastonetes e Cocos formadores de esporos.

FAMÍLIA: *Bacillaceae*

GÊNERO	-	<i>Clostridium</i>
ESPÉCIE	-	<i>Clostridium perfringens</i>

13.2. Características básicas

- bactéria Gram positiva
- bastonete
- esporulado
- imóvel
- produtor de toxina
- patogênico
- anaeróbio - aerotolerante, não necessita de condição estritamente anaeróbia
- pH entre 5,5 e 8,0
- temperatura entre 20 e 50°C (ótima entre 30 e 40°C)
- atividade de água mínima em torno de 0,93
- fermenta a lactose, produzindo ácido

13.3. Hábitat natural

Solo, águas residuais, poeira, fezes do homem e dos animais.

13.4. Alimentos propícios

Os esporos deste microrganismo estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em vários alimentos.

Desenvolvem-se bem em carnes depois de cozidas, ou alimentos aquecidos e que foram resfriados lentamente, e consumidos tardiamente. Tem-se também encontrado originando intoxicação alimentar em pasta de pescado e frango refrigerado.

13.4.1. Significado nos alimentos

A presença de clostrídios mesófilos, em alimentos enlatados de baixa acidez, indica que possivelmente o tratamento térmico foi insuficiente para destruir os esporos de *C.botulinum* que possam existir nos alimentos perecíveis; se detectados em baixo número pode indicar higiene deficiente. Contagens mais elevadas podem ser decorrentes de permanência do produto em temperaturas de multiplicação.

13.5. Intoxicação por *C.perfringens*

13.5.1. Toxina

A enterotoxina produzida por este microrganismo está diretamente ligada a produção de esporos. Vários estudos indicam que a proteína (enterotoxina) é parte estrutural do revestimento do esporo que é produzido por algumas cepas, sendo liberada após a lise das células esporulantes.

Esta toxina é termolábil, sendo que 90% de sua atividade se perde em 4 minutos a 60°C.

13.5.2. Sintomatologia

- a) período de incubação: os sintomas aparecem entre 6 a 24 horas após a ingestão do alimento, especialmente entre 8 e 12 horas.
- b) sintomas: diarreia, náuseas, dor de cabeça.
- c) duração: 12 a 24 horas.

13.6. Meios de cultura

13.6.1. Ágar seletivo para *C.perfringens* seg. Angelotti (Ágar SPS)

a) Composição:

Peptonã de caseína	15,0 g
Extrato de levedura	10,0 g
Citrato férrico	0,5 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser 7,0 ± 0,2.

Autoclavar a 121°C /15 min.

Após esterilização, resfriar imediatamente em água fria ou em geladeira.

A cada litro de meio esterilizado adicionar as seguintes soluções, esterilizadas por filtração:

Solução a 10% de sulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	-	5,0 ml
Solução a 0,2% de polimixina B	-	10,0 ml
Solução a 1,2% de sulfadiazina sódica	-	10,0 ml

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante

b) Característica do Crescimento: colônias médias e negras (Fig. 60).

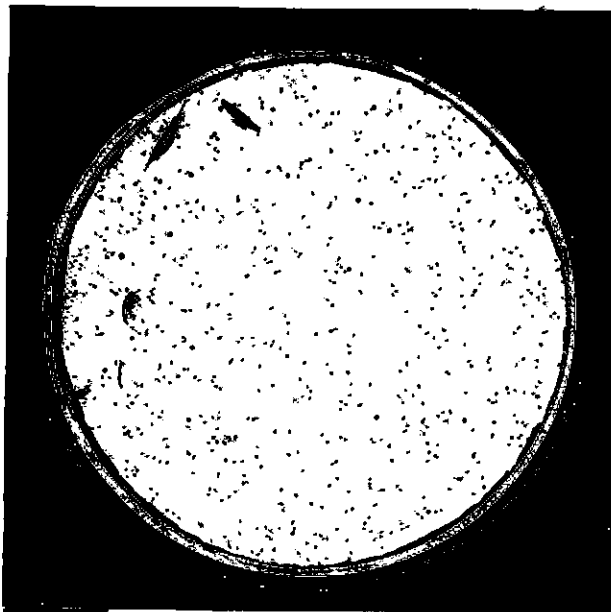


FIG. 60 Ágar SPS com crescimento característico de *C. perfringens*

13.6.2. Ágar triptose sulfito-cicloserina (base)

Este meio é um substrato basal, no qual pode-se preparar dois outros meios:

- Ágar TSC com adição de cicloserina
- Ágar SFP seg. Shahidi e Ferguson com adição de polimixina e canamicina, com ou sem adição de emulsão de gema de ovo.

a) Composição:

- meio basal

Triptose	15,0 g
Peptona de farinha de soja	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Bissulfito de sódio	1,0 g
Citrato férrico amoniacal	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

Ajustar o pH a $7,6 \pm 0,2$.

Aquecer até a completa dissolução.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/10$ min.

- **Ágar TSC:** cada litro, do meio autoclavado, adicionar 10 ml de solução a 4,0% de D-cicloserina, esterilizada por filtração e 80 ml de emulsão de gema de ovo a 50% em salina, previamente pasteurizada.
- **Ágar SFP:** antes de autoclavar o meio basal, adicionar:

* Sulfato de polimixina B	3,0	mg/l
• Sulfato de canamicina	12,0	mg/l

- Estes antibióticos podem ser incorporados ao meio basal já esterilizado, como soluções esterilizadas por filtração.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

b) Característica do Crescimento em ágar TSC e SFP: colônias negras

a) Composição:

Peptona de caseína	15,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Glicose	5,0	g
L-Cisteína	0,5	g
Cloreto de sódio	2,5	g
Tioglicolato de sódio	0,5	g
Resazurina sódica*	0,001	g
Ágar	0,75	g
Água destilada*	1000	ml

* ausentes no caldo.

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,1 \pm 0,1$.

Aquecer, se necessário, até a completa dissolução.

Distribuir volumes de 9 ml em tubos de 16 x 150 mm.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

Observação: Na forma desidratada, proceder conforme instruções do fabricante.

13.7. Provas bioquímicas

13.7.1. Prova de redução do nitrato e de motilidade

a) Meio de cultura: ágar nitrato-motilidade

• Composição:

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Nitrato de potássio	1,0 g
Ágar	3,0 g
Água-destilada	1000 ml

Dissolver os componentes em água destilada.

O pH final deste meio deve ser $7,0 \pm 0,2$.

Misturar bem e aquecer até a completa dissolução.

Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C} / 15$ min.

• Reativo para o Nitrato: (vide preparação no item 12.7.2.1)

b) Forma de Atuação: esta prova bioquímica é utilizada para verificar a motilidade e a habilidade do microorganismo em reduzir o nitrato a nitrito.

c) Resultado (Fig. 61):

• positivo:

- * motilidade: os microrganismos móveis migram da linha de perfuração, difundindo-se por todo o meio, causando a turvação do mesmo.
- * redução do nitrato a nitrito: aparecimento de uma coloração de rosa para vermelho no meio, após adição do reativo.

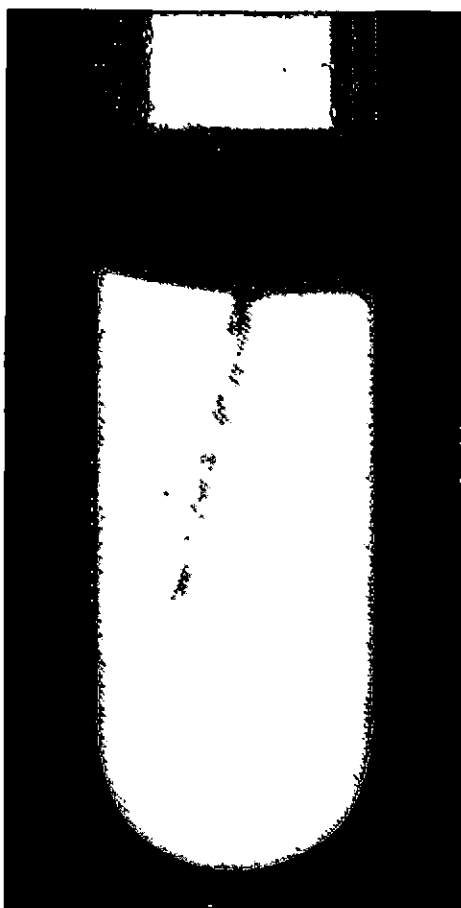


FIG. 61 Ágar nitrato-motilidade com redução do nitrato a nitrito positivo e motilidade negativa

13.7.2. Prova de fermentação da lactose e motilidade

a) Meio de cultura: ágar lactose-motilidade

• Composição:

Triptose	15,0 g
Extrato de levedura	10,0 g
Lactose	10,0 g
Monofosfato de sódio	5,0 g
Vermelho de fenol	0,05 g
Ágar	3,0 g
Água destilada	1.000 ml

Dissolver os componentes em água destilada, exceto a lactose e o vermelho de fenol.

Acertar o pH para $7,5 \pm 0,2$.
Adicionar, então, os demais componentes.
Aquecer até a completa a dissolução.
Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm.
Autoclavar a $121^{\circ}\text{C}/15$ min.

b) **Forma de Atuação:** esta prova é para testar a habilidade do microrganismo em fermentar a lactose, bem como verificar a motilidade.

c) **Resultado (Fig. 62):**

• **positivo:**

- * **motilidade:** o microrganismo móvel migra da linha de perfuração, difundindo-se por todo meio.
- * **fermentação da lactose:** mudança da cor do meio de vermelho para amarelo.

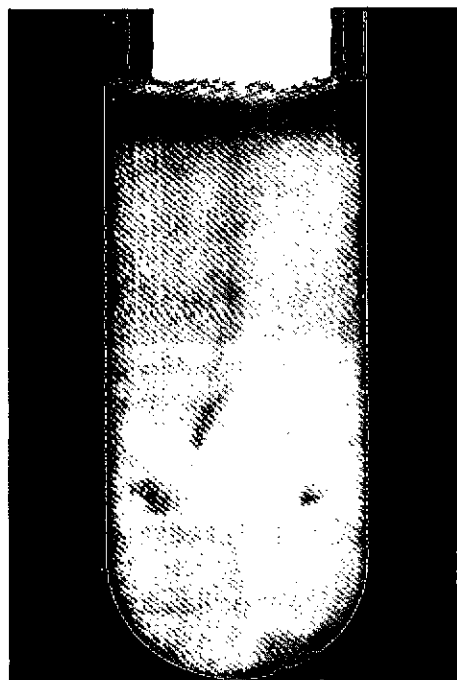


FIG. 62 Ágar lactose-motilidade com fermentação da lactose positiva e motilidade negativa.

13.7.3. Prova de coagulação do leite

a) Meio de cultura: meio de leite e ferro

• **Composição:**

Leite desnatado	10,0 g
Água destilada	100 ml

Dissolver o leite desnatado em água destilada.

Distribuir volumes de 3 ml em tubos de 13 x 100 mm contendo malhas de ferro ao fundo.

Autoclavar a 116 °C/15 min.

b) **Forma de Atuação:** esta prova serve para verificar a atuação de um microrganismo sobre o leite (coagulação, peptonização e produção de gás, principalmente).

c) **Resultado** (Figs. 63 e 64):

- **positivo:** coagulação do leite e escurecimento do meio.

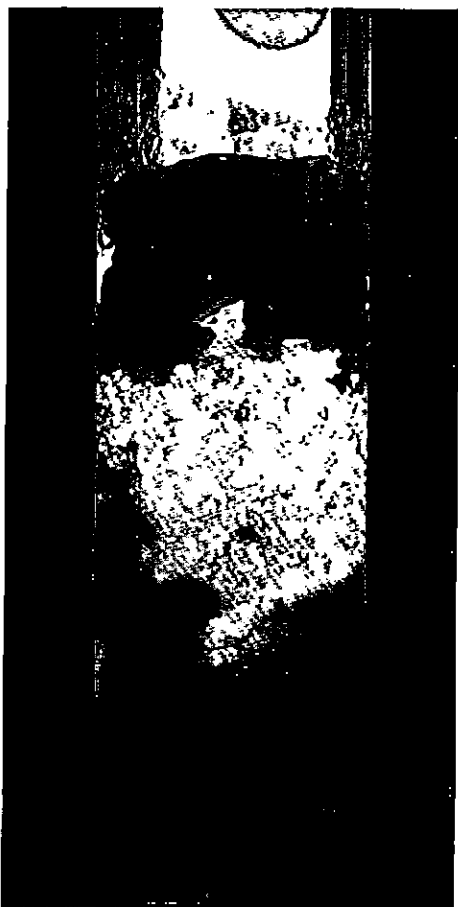


FIG. 63 Meio de leite e ferro com crescimento positivo.



FIG. 64 Meio de leite e ferro com crescimento negativo.

13.8. Metodologia e técnicas de análise

13.8.1. Técnicas de análise (Fig. 65)

- a) retirar assepticamente 25g ou 25ml da amostra e preparar as diluições sucessivas conforme descrito no item 4.3.;

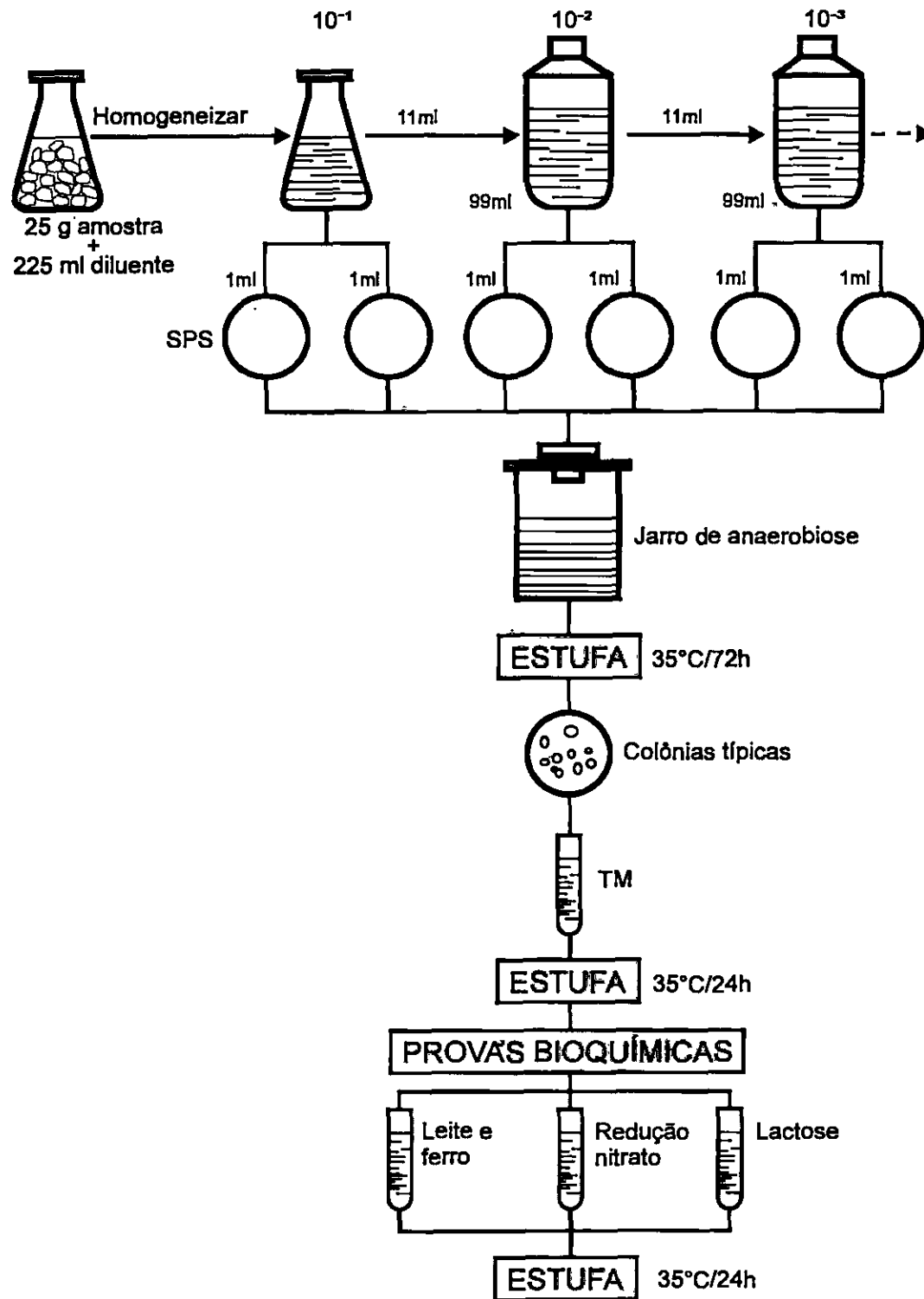
- b) pipetar alíquotas de 1 ml de cada diluição e colocar em placas de Petri (100 x 15 mm) esterilizadas, fazendo sempre placas em duplicatas de cada diluição;
- c) adicionar a cada placa, 15-20 ml do ágar SPS, previamente fundido e resfriado a 50°C;
- d) homogeneizar, com movimentos suaves em forma de oito, e permitir a sua solidificação;
- e) após a solidificação, acrescentar cerca de 10 ml do meio fundido e resfriado, e permitir mais uma vez a sua solidificação;
- f) colocar as placas em posição invertida em jarros de anaerobiose com o envelope produtor de CO₂ e H₂ (sistema GASPAC) e o papel indicador de anaerobiose;
- g) incubar a 35-37°C/72 horas;
- h) contar o número total de colônias negras e selecionar 2 ou 3 colônias típicas por placas, transferindo-as para o meio de tioglicolato;
- i) incubar a 35-37°C /6-12 horas (até que apresente leve crescimento);
- j) comprovar como presuntiva para *C.perfringens*, utilizando os seguintes meios: ágar nitrato-motilidade, ágar lactose-motilidade, e meio de leite e ferro;
- k) incubar a 35-37°C/ 24 horas.

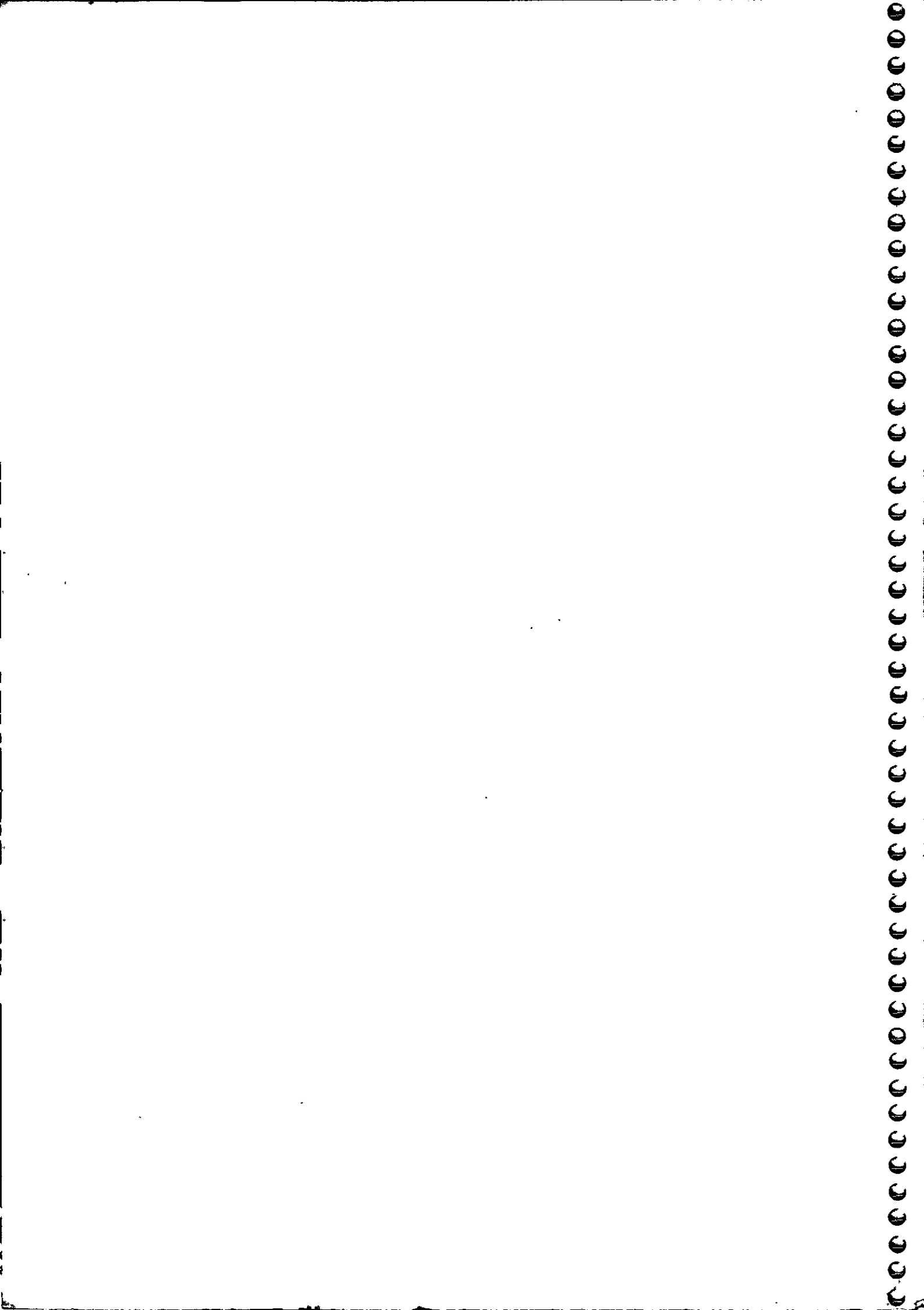
13.8.1.1. Interpretação das provas bioquímicas

- Características de *C.perfringens*:

* redução de nitrato a nitrito	+
* motilidade	-
* fermentação da lactose	+
* coagulação do leite	+

FIG. 65. Esquema da técnica de análise de *C. perfringens*





14. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. 3.ed. New York: Academic Press, 1988. 803p.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. *Introducción a la micología*. 2.ed. Barcelona: Ed.Omega S.A., 1985. 638p.
- BANWART, G.J. *Microbiología básica de los alimentos*. Barcelona: Bellaterra, 1982. 464p.
- CURSO sobre exame microbiológico do leite pasteurizado e produtos lácteos. In: Congresso Nacional de laticínios, Juiz de Fora, 1986. Juiz de Fora: EPAMIG, 1986. 58 p.
- DELAZARI, I. Aspectos microbiológicos de alimentos desidratados. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.16, n.31 p. 227-260, 1979.
- LEITÃO, M.F de F; EIROA, M.N.U. *Curso de microbiologia de alimentos*. Campinas: ITAL, 1980. 103p. Mimeografado.
- FRAZIER, W.C. *Microbiologia de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1976. 512p.
- HERSOM, A.C.; HULLAND, E.D. *Conservas alimentícias*. Zaragoza: Acribia, 1974. 360p.
- JAY, J.M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1978. 491p.
- MANUAL de meios de cultivo. Darmstadt: Merck, 1982. 189p.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C. *Introdução à microbiologia*. In: *Microbiologia*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v.1, p.3-17, parte I.
- SPECK, M.L. ed. *Compendium for the microbiological examination of foods*. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1976. 701p.
- THATCHER, E.S.; CLARK, D.S. *Análisis microbiológico de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1973. 271 p.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH EDUCATION AND WELFARE. *Bacteriological analytical manual for foods*. 4 ed Washington, 1976.

