

PEDIDO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES PRÁTICAS PRESENCIAIS NO IFRS CAMPUS DE ERECHIM

Curso: Superior em Engenharia de Alimentos

Disciplina: Laboratório Microbiologia e Microscopia

Docente responsável pelo componente curricular: Maria Carolina Esmelindro Rodrigues (Professora Substituta – 40 h)

Informações sobre o componente curricular:

A disciplina de Microbiologia de Alimentos é um componente curricular ofertado no 4º semestre do Curso Superior em Engenharia de Alimentos, com uma carga horária total de 66 horas-relógio e destas, 44 horas são destinadas a atividades teóricas e 22 horas são destinadas à realização de atividades práticas.

O objetivo geral é oferecer aos discentes uma compreensão sobre os fatores que afetam o desenvolvimento microbiano nos alimentos, as características dos microrganismos envolvidos na produção, deterioração e nas doenças transmitidas através dos alimentos, bem como, as técnicas de pesquisa de microrganismos em alimentos e a aplicação de critérios microbiológicos. Como ementa, o componente curricular contempla: Fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o desenvolvimento microbiano em alimentos. Alterações químicas causadas por microrganismos. Deterioração microbiana de alimentos. Doenças transmitidas através dos alimentos. Microbiota dos alimentos. Gêneros e espécies de microrganismos com importância em alimentos. Ensaio microbiológicos. Critérios microbiológicos.

São doze (12) o número total de estudantes matriculados em Microbiologia de Alimentos (2021/2). O componente curricular está sendo ministrado de maneira remota com conteúdo teórico programado para os primeiros meses do presente semestre (2021/2) e as aulas práticas estariam programadas para o final do semestre, conforme pode ser verificado no cronograma que se encontra no final deste documento.

Espaço para realização das atividades práticas:

As aulas práticas do componente curricular de Microbiologia de Alimentos serão realizadas no Laboratório de Microbiologia e Microscopia, localizado no segundo andar do Bloco III do IFRS *Campus* Erechim. O laboratório contempla uma área total de 139,20 metros quadrados (dividido em 5 ambientes) com boa ventilação. A sala de microscopia contém janelas externas. No local com as bancadas para preparo de amostras também existem janelas superiores. Conforme o Plano de Contingência para prevenção, monitoramento e controle do novo coronavírus - Covid-19, a capacidade máxima prevista para a ocupação do Laboratório de Microbiologia seria de até oito pessoas por aula, sendo seis estudantes, um docente e um técnico de laboratório. Sendo assim, a turma de 12 alunos será dividida em duas turmas para a realização das atividades práticas. No dia em que uma parte da turma estará no laboratório fazendo aula prática a outra metade estará fazendo atividade teórica assíncrona.

Protocolos de Biossegurança:

O componente curricular, uma vez ofertado, será ministrado no período noturno, e desta forma, também há a expectativa de menor fluxo de pessoas durante um possível deslocamento coletivo (transporte público) até o local. Além disso, os discentes serão orientados periodicamente quanto às propostas de prevenção e manutenção dos cuidados pessoais contra o Coronavírus, como as seguintes medidas:

Ao sair de casa:

- Evitar levar itens desnecessários à aulas;
- Certificar de estar levando máscaras extras para as eventuais trocas.
- Levar embalagens, tais como sacos plásticos com fechamento hermético, para acondicionar as máscaras usadas.
- Não emprestar ou usar máscaras de outras pessoas;
- Se possível, ter sempre um recipiente com álcool em gel 70%, ou outro produto devidamente aprovado pela Anvisa, para higienização das mãos.
- Manter os cabelos continuamente protegidos;
- Fazer barba e bigode diariamente;
- Ao chegar à sua estação de trabalho ou estudos, deixar os pertences em um local seguro externo ao Laboratório e higienizar as mãos.
- Trazer calçado fechado para a realização das aulas práticas;
- Realizar a aferição da temperatura corpórea e, em caso de temperatura acima de 37,5°C, não se deslocar até o Campus, comunicar aos professores e monitorar a situação com profissional médico.

No deslocamento para o IFRS - Campus Erechim:

- Caso usem o transporte coletivo: higienizar as mãos antes e depois do percurso; se possível, usá-lo em horários de menor circulação de pessoas; caso esteja com muitos passageiros, esperar outro veículo;
- Evitar fazer o pagamento com dinheiro, priorizando o uso de cartão ou do sistema de bilhetagem eletrônica;
- Verificar a possibilidade de manter abertas as janelas dos veículos, a fim de possibilitar maior circulação de ar;
- Caso estejam indo ao trabalho em veículo próprio, taxi ou aplicativo, higienizar as mãos antes de entrar e ao sair do carro, evitando tocar desnecessariamente nas superfícies do automóvel;
- Caso sejam os motoristas dos veículos, higienizar com álcool em gel 70%, ou outro produto devidamente aprovado pela Anvisa, a maçaneta, o volante, a manopla do câmbio e o cinto de segurança;
- Usar máscaras durante todo o deslocamento para o IFRS *Campus* Erechim e nas dependências do Campus;
- Evitar levar as mãos ao rosto, boca, olhos, nariz.

Os protocolos de Prevenção Obrigatórios e Complementares estão em consonância com as orientações do Plano de Contingência para prevenção, monitoramento e controle do novo coronavírus – Covid-19, elaborado pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul. Sendo assim, seguem as medidas a serem adotadas para a realização das atividades práticas do componente curricular de Microbiologia de Alimentos, nas dependências do IFRS *Campus* Erechim.

Anterior à realização da aula prática:

- **Sanitização de bancadas e equipamentos (30 minutos anterior ao encontro presencial):** todos os equipamentos alocados no laboratório serão cuidadosamente higienizados pela professora

responsável pelo componente curricular. Para isso, se utilizará álcool etílico a 70%, substância recomendada para a higienização de superfícies;

- **Ventilação:** 30 minutos antes e durante todo o encontro presencial, todas as janelas e portas do Laboratório, deverão permanecer abertas, privilegiando uma renovação frequente do ar;
- **Demarcação dos espaços:** serão demarcados os espaços no piso, com fita adesiva, para que cada indivíduo possa permanecer durante o encontro, respeitando o distanciamento mínimo de 1,5 m, uma vez que todos estarão utilizando EPIs;
- **Entrada no Laboratório:** na porta de entrada, será disponibilizado frasco de álcool em gel 70% para a higienização das mãos e máscaras de proteção individual descartáveis. Também, será disposto um tapete sanitizante contendo solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, permitindo que todos higienizem seus calçados a cada entrada no ambiente;
- **Aferição da temperatura corpórea:** será realizada a aferição da temperatura corpórea de todos os presentes antes da entrada no Laboratório. Para isso, se usará um termômetro de infravermelho, não sendo permitida a entrada de pessoas que excedam a temperatura de 37,5°C ou que apresentem sintomas gripais;
- O uso de jaleco, touca descartável (cobrindo todo cabelo e orelha, sem uso de adornos), também será obrigatório a todos os presentes, além do não manuseio de celulares e bolsas no recinto, os quais deverão permanecer nos locais de armazenamento de materiais pessoais, externos ao Laboratório.

Durante a realização das atividades:

Nos espaços em que ocorrerão as atividades (bancada, microscópios), os assentos serão dispostos respeitando o distanciamento (1,5m). Da mesma forma, quando o discente realizar o experimento, será disponibilizada e orientada a utilização de luvas descartáveis e, imediatamente após o término do experimento, realizada nova higienização com álcool etílico a 70%, até que todos tenham realizado a atividade. Será obrigatória a utilização de máscaras de proteção individual durante todo o período de permanência no laboratório bem como, em todas as dependências do *Campus*. Poderão ser utilizados somente os sanitários do mesmo andar do Laboratório de Microbiologia e Microscopia, a fim de evitar ao máximo a circulação pelos espaços do Bloco III. Neste espaço, será disponibilizado dispensador com sabonete líquido, papel toalha e álcool etílico 70% para higienização das mãos.

Além do disposto nesse documento, deverão ser respeitados todos os procedimentos estabelecidos no Manual de Procedimentos dos Laboratórios e Usinas Piloto de Alimentos do IFRS *Campus* Erechim, aprovado pelo Conselho de *Campus* (Resolução nº 07, de 14 de junho de 2018). Esse Manual contém instruções muito detalhadas, no sentido de evitar contaminações por diferentes microrganismos, pelo caráter perecível dos alimentos e também pelo perigo que a manipulação inadequada pode acarretar à saúde dos consumidores. Essas instruções são muito adequadas também para evitar o risco de infecção pelo coronavírus e por outros vírus, que são transmitidos pela saliva, que ficam alojados em pêlos, cabelos, unhas, pele dos manipuladores. Por isso, os mesmos cuidados reportados no Manual podem ser utilizados para prevenir a infecção pelo novo coronavírus.

Após a realização das atividades:

Ao finalizar as atividades propostas, todo o material utilizado no experimento será higienizado com álcool

etílico a 70%.

Recursos Humanos:

Para o desenvolvimento das atividades, além da docente responsável pelo componente curricular, será necessária a presença de um técnico de laboratório e também uma pessoa para realizar a higienização do ambiente, anterior e posterior à realização das práticas.

Cronograma/ Conteúdo Programático da Disciplina de Microbiologia de Alimentos (2021/2)

Cronograma	
Datas das Aulas (4 períodos/encontro)	Conteúdo Programático
09/09/21	- Semana de acolhimento. - Informações gerais da disciplina: ementa, objetivos, conteúdo programático. - Participação de alunos e professores no III Workshop de Ações Afirmativas, Inclusivas e da Diversidade.
16/09/21	Introdução à microbiologia dos alimentos. Importância dos microrganismos nos alimentos. Fontes de contaminação em alimentos. (Aula Teórica)
23/09/21	Microrganismos de importância em alimentos – Bactérias. (Aula Teórica)
30/09/21	Microrganismos de importância em alimentos – Fungos. (Aula Teórica)
07/10/21	Doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs). (Aula Teórica)
14/10/21	Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano em alimentos. (Aula Teórica)
21/10/21	Atividade Síncrona – Tira dúvidas e discussão do conteúdo para a prova.
28/10/21	AVALIAÇÃO (Prova 1 - online no moodle)
04/11/21	Microrganismos Indicadores de segurança e qualidade nos alimentos. (Aula Teórica)
06/11/21	Sábado Letivo - Alterações nos alimentos causadas por microrganismos. (Aula Teórica)
11/11/21	Aplicações Biotecnológicas dos microrganismos (alimentos). (Aula Teórica)
18/11/21	Atividade Síncrona – Tira dúvidas e discussão do conteúdo para a prova. E discussão dos procedimentos/protocolos para as aulas de laboratório.
25/11/21	AVALIAÇÃO (Prova 2 - online no moodle)
02/12/21	Preparo de amostra para análise - Meios de Cultura, Técnicas de Semeadura. (Aula Prática)
09/12/21	Contagem de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e termófilos em alimentos. (Aula Prática)
16/12/21	Contagem de bolores e leveduras em alimentos. (Aula Prática)
06/01/22	NMP de coliformes totais e coliformes termotolerantes. (Aula Prática)
13/01/22	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>. Análise de <i>Staphylococcus aureus</i>. (Aula Prática) Entrega AVALIAÇÃO (Trabalho final)

Descrição dos Materiais e Equipamentos que serão Utilizados nas Aulas Práticas: o roteiro com a descrição detalhada das aulas práticas está no final do documento (ANEXO).

Sendo assim, com base no exposto e procedimentos elencados acima, a docente responsável pelo componente curricular solicita a análise pelo Comitê de Crise e Grupo de Trabalho do Retorno Seguro para posterior encaminhamento e aprovação pelo do Conselho de Campus- CONCAMP.

Cordialmente,

MARIA CAROLINA
ESMELINDRO
RODRIGUES:81491
964049

Assinado de forma digital
por MARIA CAROLINA
ESMELINDRO
RODRIGUES:81491964049
Dados: 2021.10.14 20:25:36
-03'00'

Docente Responsável

ANEXO

ROTEIRO DAS AULAS PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

AULA PRÁTICA 1

- PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE (PARTE 1)

Descrever o procedimento de preparo da suspensão inicial e das diluições decimais das amostras para análises microbiológicas.

OBJETIVO: A diluição das amostras garante a inoculação adequada dos microrganismos no meio de cultura.

REFERÊNCIAS NORMATIVAS: ISO 6887-1: 2011.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS:

- Álcool 70%; Algodão;
- Tubos de ensaio ou frascos com diluente apropriado, na quantidade necessária para a amostra (9 partes de diluente para uma parte de amostra);
- Ponteiras de 1 mL; Micropipetador de 1 mL; Agitador de tubos;
- Homogeneizador de amostras (*Stomacher*);
- Bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar.

PROCEDIMENTO:

1. Efetuar a pesagem da amostra;
2. Com a chama ligada, adicionar à bolsa com a amostra, o diluente na proporção indicada;
3. Homogeneizar no *stomacher*;
4. Se a amostra possuir grandes partículas, deixar descansar para que as mesmas sedimentem. Esta será a suspensão inicial.
5. Com auxílio de ponteira e micropipetador estéreis, subtrair 1 mL desta suspensão e repassar para um tubo de ensaio contendo o diluente apropriado;
6. Homogeneizar com o agitador de tubos. Esta será a primeira diluição decimal, e a partir dela, serão feitas as sucessivas diluições, de acordo com a necessidade de cada amostra.

- PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA (PARTE 2)

Meios de cultura desidratados fornecidos por diferentes fabricantes podem apresentar pequenas diferenças em suas composições. Observar atentamente a quantidade necessária de meio desidratado, em gramas por litro de meio a ser preparado, o modo de preparo, o tempo e a temperatura de esterilização em cada caso. Ao adquirir meios de cultura, observar atentamente a formulação, comparando-a com aquela indicada neste manual. Às vezes, as diferentes marcas utilizam diferentes termos para uma mesma substância. Por exemplo, os termos triptona e tripticase referem-se à peptona de caseína obtida por digestão triptica ou pancreática. Assim, os produtos Ágar tripticase soja, Ágar soja triptona, Caso Ágar (antigo Casoy) referem-se à um produto que contém peptona de caseína (obtida por digestão triptica ou pancreática) e peptona de farinha de soja.

PREPARAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA:

- Os meios comerciais devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.
- Os meios preparados não comerciais devem ser pesados separadamente em papel manteiga ou papel alumínio e adicionados em um único frasco (normalmente em béquer), hidratar em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.
- Sempre que for necessário, levar o meio para fundir, usar vidro Pyrex®, aquecer sobre a tela de amianto ou similar e tripé, no bico de Bunsen ou, se permitido, em micro-ondas.
- Usar sempre luvas térmicas apropriadas para laboratório para manipular vidrarias quentes;

- Sempre que for usado o termo “esterilizar em autoclave”, o tempo de esterilização e a temperatura deve ser compatível com o meio a ser produzido, conforme orientação do fabricante.
- Sempre que for usado o termo “esterilizar por filtração”, usar o filtro com porosidade de 0,22 micra, recomendado para partículas bacterianas.
- Quando distribuir o meio antes de autoclavar, os tubos não precisam estar esterilizados;
- Quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis.
- Os meios devem ser autoclavados com as tampas semiabertas, para que a esterilização seja por igual em todo o conteúdo dos tubos - tampas fechadas não permitem a entrada do vapor.

CONTROLE DE QUALIDADE, ESTERILIDADE E CRESCIMENTO :

- Para controle dos meios confeccionados, incubar placas ou tubos não inoculados à 36 ± 1 °C por 24 horas.
- Não deve haver mudança de cor nem crescimento de qualquer colônia.
- Para o controle de crescimento, sempre que possível usar cepas ATCC, que são cepas de referências de origem e padrão definido de provas para a sua caracterização.
- Se não for possível o uso de cepas ATCC, usar cepas 100% positivas para os controles de qualidade de crescimento realizados.

RECOMENDAÇÕES GERAIS:

- Evitar usar meios vencidos (liofilizados e prontos para uso); se usar, certificar-se com o controle de crescimento de que realmente está funcionando.
- Não usar meios prontos para uso em tubos ou placas que estejam ressecados.
- Observar com atenção para as instruções de alguns inóculos que são específicos para alguns meios de cultura.
- Recomenda-se o uso de tubos com tampa de rosca, pois evitam o ressecamento rápido do meio (tamanho dos tubos utilizados geralmente são de 11 por 100 mm).
- Todos os meios confeccionados devem ser devidamente identificados com o nome, data de fabricação e data de validade.
- Todos os meios de placa devem ser embalados em filme plástico PVC transparente para evitar o ressecamento.
- Evitar o uso de sacos plásticos para embalar as placas, pois a água de condensação formada facilita a proliferação de fungos; para meios de cultura em tubos, colocar em sacos plásticos, procurando tirar o excesso de ar. Convém guardar os tubos com meios preparados em sacos plásticos, para sua maior segurança.

AULA PRÁTICA 2 – CONTAGEM DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS E TERMÓFILOS EM ALIMENTOS.

OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO:

Aplica-se à enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis em amostras matérias-primas, alimentos e água.

DOCUMENTOS COMPLEMENTARES:

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e

diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

EQUIPAMENTOS:

Balança de precisão; Equipamento de homogeneização; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 36 +/- 1 °C.

REAGENTES E MATERIAIS:

Ágar PCA; Solução de TTC; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; placas de petri.

DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO:

- Pesar a amostra, e efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.
- Dispensar 1 mL de amostra e das diluições necessárias em placas de petri identificadas.
- Verter de 15 a 20 mL de ágar PCA sobre a amostra, homogeneizar e esperar solidificar.
- Incubar as placas de petri invertidas a 36 +/- 1 °C, durante 48 horas.
- Selecionar as placas para leitura, da seguinte forma:
- Entre 25 e 250 colônias para produtos em geral e entre 20 e 300 colônias para água.

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS:

Contar as colônias e expressar o resultado em UFC/g ou mL.

DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA:

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. IN Nº 62, 26 de agosto de 2003.

AULA PRÁTICA 3 - CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM ALIMENTOS

OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO:

Aplica-se à enumeração de bolores e leveduras em produtos cuja atividade de água seja maior que 0,95.

DOCUMENTOS COMPLEMENTARES:

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

EQUIPAMENTOS:

Balança semianalítica; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; incubadora a 25 °C +/- 1 °C.

REAGENTES E MATERIAIS:

Ágar Base Diclorano Rosa de Bengala com Cloranfenicol (DRBC); Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; pinça, bisturi e cabo para este, estêreis; saqueta plástica estéril; ponteira de 1 mL estéril; alça de drigalski estéril; placas de petri.

1. DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

1.1 CONCEITOS:

Colônia

Acúmulo de massa microbiana localizada e visível desenvolvida sobre ou dentro de meio nutriente sólido a partir de uma partícula viável.

Leveduras

Microrganismos aeróbicos mesofílicos, os quais, a 25 °C em meio ágar micológico sob as condições estabelecidas nesta parte da ISO 21527, desenvolvem colônias redondas, foscas ou não, sobre a superfície domeio, geralmente possuindo borda regular e superfície medianamente convexa.

Bolores

Microrganismos filamentosos, mesofílicos e aeróbicos, os quais, em meio ágar micológico sob as condições estabelecidas nesta parte da ISO 21527, desenvolvem propágulos/gametângios ou colônias, achatados ou aveludados, geralmente com corpos de frutificação ou esporos coloridos.

1.2 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra e/ou efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

1.3 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 0,1 mL de amostra na superfície do ágar nas placas de petri identificadas. Espalhar o inóculo com alça de drigalski.

1.4 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri sem inverter a 25 +/- 1 °C, durante 5 dias.

1.5 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Contar as colônias presentes nas placas contendo até 150 colônias. Bolores e leveduras devem ser contados separadamente.

1.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Expressar o resultado em UFC/mL ou UFC/g.

NOTA: manipular as placas com cuidado devido a facilidade da dispersão de esporos no ar.

AULA PRÁTICA 4 - NMP DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES

1- OBJETIVO

Estabelecer passos para determinar a Contagem de Coliformes Totais e a 45°C pelo NMP em alimentos e águas.

2 - MATERIAIS NECESSÁRIOS

- 1 - Água peptonada 0,1% (frasco com 225mL e tubos com 9mL)
- 2 - Pipeta sorológica de 1mL
- 3 - Tubos com caldo LST (Lauril Sulfato Triptose) em concentração dupla e simples
- 4 - Tubos com caldo VB (Verde Brilhante Bile 2% lactose)
- 5 - Tubos com caldo EC
- 6 - Estufa regulada a T° = 36°C +/- 1°C
- 7 - Banho-maria regulado a 45°C +/- 0,5°C
- 8 - Câmara de fluxo laminar
- 9 - Agitador de tubos
- 10 - Stomacher
- 11 - Cepa padrão positiva: cultura de *E.coli* com 24 horas
- 12 - Cepa padrão negativa: cultura de *E.aerogenes* com 24 horas

3 – PROCEDIMENTO

Os coliformes totais são bastonetes gram negativos não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e

espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*, por exemplo. Por essa razão, sua enumeração em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes fecais ou *E.coli*. Porém, sua presença em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo (principalmente no caso da pasteurização), evidenciando práticas de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos.

Os coliformes a 45°C possuem a mesma definição dos coliformes totais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24/48 horas a $T^{\circ} = 45,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Esta definição objetivou, em princípio, selecionar apenas os coliformes originários do trato gastrointestinal. Atualmente sabe-se, entretanto, que o grupo dos coliformes a 45°C inclui pelo menos três gêneros, *Escherichias*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal. Por este motivo, a presença de coliformes a 45°C em alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *E.coli*, porém, muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *E.coli* dentro do grupo fecal.

Dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais, *E.coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Todos os demais membros do grupo têm uma associação duvidosa com a contaminação fecal e a *E.coli*, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento. O grupo dos coliformes fecais, constituído principalmente por *Escherichia coli*, são bons indicadores de contaminação fecal recente, e consequentemente da possibilidade da presença de patogênicos, transmitidos pelas fezes, nos alimentos.

As denominações “Coliforme a 45°C” e “Coliforme Total” não têm validade taxonômica, servindo apenas para designar grupos de bactérias capazes de crescer em condições experimentais definidas. A determinação de coliformes totais é utilizada como indicador higiênico, sendo que a presença de coliformes fecais indica um risco da presença de outros microrganismos patogênicos de origem fecal.

FONTE - Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos
Manual Técnico - N.º 14 ITAL, 1995

AULA PRÁTICA 5 – CONTAGEM DE ENTEROBACTERIACEAE

OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à enumeração de colônias de *Enterobacteriaceae* em análises microbiológicas.

DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

REAGENTES E MATERIAIS:

Ágar VRBG; ágar Nutriente; ágar Glicose; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; pinça, bisturi e cabo para este, estéreis; saqueta plástica estéril; ponteira de 1 mL estéril; alça de drigalski estéril; placas de petri.

DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO:

1.1 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra e / ou efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

1.2 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 1 mL de amostra na placa de petri identificada.

Verter 10 mL de ágar VRBG sobre o inóculo e homogeneizar. Deixar solidificar e verter mais 15 mL de ágar como cobertura para criar um ambiente de semianaerobiose.

1.3 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri invertidas a 37 +/- 1 °C, durante 24 +/- 2 horas.

1.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

- Selecionar as placas contendo até 150 colônias características (rosa até vermelho ou roxa, com ou sem halo).
- Contar as colônias características e selecionar aleatoriamente 5 destas para repique.
- Estriar as colônias selecionadas sobre o ágar nutriente e incubar a 37 +/- 1 °C, durante 24 +/- 2 horas.
- Realizar o teste de oxidase, estriando uma colônia sobre a tira teste. Não havendo mudança de cor, conforme indicação do fabricante das tiras, considerar o teste negativo.

1.5 TESTE DE FERMENTAÇÃO

Com agulha de inoculação, semear as colônias negativas para oxidase, em tubos com ágar glicose e incubá-los a 37 +/- 1 °C, durante 24 +/- 2 horas.

O desenvolvimento de uma coloração amarelada no meio indica resultado positivo.

1.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Colônias glicose positivas e oxidase negativas são consideradas *Enterobacteriaceae*.

Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA:

Norma ISO 21528-2:2004.

AULA PRÁTICA 6 – CONTAGEM DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM ALIMENTOS

1- OBJETIVO

Estabelecer passos para determinar a contagem de *Staphylococcus aureus* em alimentos.

2 - MATERIAIS NECESSÁRIOS

- 1 - Água salina peptonada (frasco com 225mL e tubos com 9mL)
- 2 - Placas com Ágar Baird-Parker
- 3 - Caldo BHI
- 4 - Plasma de Coelho (Coagulase Plasma – EDTA)
- 5 - Tubos de ensaio 13 x 100mm esterilizados
- 6 - Agitador de tubos
- 7 - Estufa regulada a T°= 35°C
- 8 - Alça de platina
- 9 - Semeador
- 10- Pipetas sorológicas de 1mL
- 11- Bico de Bunsen
- 12- Homogenizador
- 13- Desinfetante
- 14- ABNT MB-3464/1991

3 - PROCEDIMENTO

A contagem de *Staphylococcus aureus* em alimentos pode ser feita com dois objetivos diferentes, um relacionado com a saúde pública, para confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar através da

produção da enterotoxina estafilocócica, e outro com o controle da qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, condição em que *S.aureus* serve como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanificação das superfícies destinadas ao contato com alimentos. As principais características utilizadas no isolamento de *S.aureus* são as características seletivas, como habilidade de crescer na presença de 10% de NaCl, 0,01% a 0,05% de telurito de potássio, 0,2% a 0,5% de cloreto de lítio, 0,12 a 1,26% de glicina e 40mg/l de polimixina, entre outras, e as características diferenciais, como a habilidade para reduzir o telurito de potássio, produzindo colônias pretas, a habilidade de hidrolisar a gema do ovo, por ação de lipases e/ou lecitinases, produzindo halos claros em redor das colônias, a capacidade de utilizar o manitol e de crescer a 42 – 43°C em condições seletivas, a atividade de coagulase e de termonuclease, entre outras. Há vários meios disponíveis para a contagem direta em placas, combinando uma ou mais características seletivas/diferenciais, como o Ágar Manitol Sal, o Ágar Vogel-Johnson, o Ágar Azida Gema de Ovo, o Ágar Fenolftaleína Fosfato de Polimixina, o Ágar Leite Sal, o Ágar Telurito Glicina e o Ágar Telurito Polimixina. De maneira geral, estes meios não devem ser utilizados para alimentos em que se espera a presença de células injuriadas, pois são considerados restritos para a reparação das injúrias. Atualmente, tem sido mais utilizado o Ágar Baird-Parker (BP), que combina o telurito de potássio (0,01%), a glicina (1,2%) e o cloreto de lítio (0,5%), como agentes seletivos, e a redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo, como características diferenciais. Adicionalmente, o meio contém 1% de piruvato de sódio, um agente considerado excelente coadjuvante na reparação de células injuriadas, tanto quanto a catalase, porque evita o acúmulo de peróxido de hidrogênio (tóxico para as células) produzido em condições aeróbias, durante o crescimento e reparação. O Ágar Baird-Parker (BP) pode ser utilizado para o plaqueamento direto de alimentos processados ou “in natura”, tanto na enumeração com finalidades indicativas como na enumeração com finalidades de saúde pública. Por outro lado, o Ágar BP, bem como todos os demais meios citados, não é capaz de suprimir completamente o crescimento de competidores de *S.aureus*, particularmente outras espécies não patogênicas do gênero *Staphylococcus*, que produzem colônias semelhantes, havendo necessidade de submeter as colônias típicas a testes adicionais para confirmação definitiva. Nestes casos, os testes mais utilizados são a atividade de coagulase, termonuclease e catalase.

FONTE – Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos Manual n.º 14. ITAL-Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas – São Paulo – 1995.

3.1 - CONTAGEM DIRETA EM PLACAS

3.1.1 – Preparar a amostra e as diluições seriadas.

3.1.2 – Inocular 0,1mL de cada diluição selecionada na superfície de placas com Ágar Baird Parker (BP), previamente preparadas e secadas.

NOTA – Inocular 1mL da primeira diluição (10^{-1}), distribuindo o volume em quatro placas, 3 com 0,3mL e uma com 0,1mL.

3.1.3 – Espalhar o inóculo com o semeador até que todo o excesso de líquido seja absorvido.

3.1.4 – Incubar as placas em posição invertida unidas de duas a duas com fita crepe em estufa regulada a $T^{\circ}=35^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

3.1.5 – Realizar a contagem selecionando as placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

3.1.5.1 – Contar as colônias típicas de *S.aureus* – colônias circulares, pretas, pequenas (máximo 1,5mm de diâmetro), lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca.

3.1.5.2 – Contar também as colônias atípicas, acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos típicos.

3.1.6 – Selecionar de 3 a 5 colônias típicas e atípicas para o teste da coagulase da diluição selecionada.

NOTA –

1. Havendo menos do que cinco colônias, tomar todas.

2. Se a placa apresentar colônias suspeitas de mais de um tipo, típicas e atípicas, selecionar de três a cinco de cada tipo, ou um número proporcional à distribuição dos diferentes tipos na placa.

3.1.7 – Transferir cada colônia para um tubo contendo Caldo Infusão Cérebro (BHI) com o auxílio de uma alça de platina.

3.1.8 – Incubar os tubos em estufa regulada a T°= 35°C durante 24 horas.

3.1.9 – Realizar o teste de coagulase.

3.1.9.1 – Transferir 0,1mL de cada cultura obtida em BHI, para um tubo de 13 x 100mm.

3.1.9.2 – Adicionar aos 0,1mL de cultura 0,3mL de Coagulase Plasma – EDTA (plasma de coelho com EDTA).

NOTA – Na realização do teste de coagulase pode-se colocar no tubo primeiro os 0,3mL do plasma e após adicionar 0,1mL da cultura.

3.1.9.3 – Misturar com movimentos de rotação, sem agitar os tubos, para não interferir na coagulação.

3.1.9.4 – Incubar em estufa regulada a T°= 35°C por 24 horas.

3.1.9.5 – Observar a formação de coágulo conforme a figura 1 da MB-3464/1991 da ABNT.

3.1.9.6 – Considerar positivas as reações de nível 3 e 4, confirmativas da presença de *S.aureus*.

3.1.9.7 – Considerar somente como *Staphylococcus* as culturas com reações positivas de nível 1 ou 2.

3.1.10 – Calcular os resultados.

3.1.10.1 – Calcular o número de UFC/g ou mL em função do número de colônias típicas e atípicas contadas, diluição inoculada, inóculo e porcentagem de colônias confirmadas.