

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA



Laboratório de Microbiologia

Departamento de Botânica e Engenharia Biológica

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

Protocolos de laboratório

Virgílio Loureiro
Maria A.S.S. Ferreira
Manuel Malfeito-Ferreira
Catarina Prista

Lisboa 2011

Índice

Segurança em microbiologia alimentar.....	3
Controlo microbiológico de superfícies.....	6
Preparação de amostras para análise microbiológica.....	8
Enumeração de Microrganismos Aeróbios “Totais”.....	11
Pesquisa de bactérias coliformes e pesquisa provável de <i>Escherichia coli</i> de origem fecal.....	14
Pesquisa e estimativa do número de enterococos em alimentos.....	17
Contagem de bactérias sulfito-redutoras crescidas em anaerobiose.	19
Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> em géneros alimentícios.....	21
Pesquisa e enumeração de <i>Lactobacillaceae</i> em géneros alimentícios.....	24
Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	26
Detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	35
Regras gerais para o cálculo e a expressão de resultados .	37
Anexo - Meios de cultura e reagentes.....	42
Bibliografia.....	53
Normas Portuguesase ISO.....	54

Segurança em microbiologia alimentar

1. INTRODUÇÃO

Num laboratório de microbiologia alimentar há dois requisitos básicos que devem ser cumpridos:

1. Evitar a contaminação das amostras;
2. Evitar que as amostras e as culturas subsequentes contaminem e se espalhem no ambiente ou contaminem o manipulador.

Para isso, é necessário garantir a segurança pessoal e a utilização de técnicas de trabalho que assegurem a ausência de contaminação dos ensaios pelo ambiente circundante.

Os riscos próprios da actividade analítica podem ser gerais e específicos devendo ser adoptados procedimentos que os eliminem ou minimizem.

Os laboratórios que efectuem análises microbiológicas de alimentos poderão ficar contaminados com microrganismos patogénicos. É por isso necessário regras de manipulação que passemos a descrever, de modo a garantir a segurança individual, colectiva e ambiental.

O nível do risco biológico dependerá do microrganismo propriamente em si, da sua quantidade, do tipo de contacto que é estabelecido e da duração desse contacto.

O Decreto-lei 84/97 de 16 de Abril classifica os **agentes biológicos**, de acordo com o seu nível de risco infeccioso em quatro grupos. As amostras de alimentos, poderão estar contaminadas com microrganismos dos Grupos de Risco Biológico de nível 1 e 2:

Grupo 1 (sem ou com baixo risco individual e comunitário)

Agente biológico cuja probabilidade de causar doenças no ser humano é baixa.

Grupo 2 (risco individual moderado e baixo risco para a comunidade)

Agente biológico que pode causar doenças no ser humano e constituir um perigo para os trabalhadores, sendo escassa a probabilidade de se propagar na comunidade e para o qual existem, em regra, meios eficazes de profilaxia ou tratamento.

Consoante os Grupos de Risco Biológico em que se enquadram os microrganismos que são manipulados em cada trabalho laboratorial, para segurança dos operadores, estão definidos quatro níveis de segurança biológica e o grau de contenção exigido em cada.

O nível de contenção usual exigido num laboratório de ensino é o nível de segurança 1. Este é o nível de segurança que se aplica aos laboratórios básicos que manipulam microrganismos do grupo de risco biológico de nível 1 (risco geral). Este nível de segurança biológica não requer qualquer protecção adicional, uma vez que os microrganismos utilizados não representam risco especial, quer para o homem quer para o ambiente, quando manipulados de acordo com as boas práticas laboratoriais. Não esquecer no entanto, que um microrganismo normalmente não associado a doença humana poderá ser lesivo em situações particulares, como a imunodeficiência ou outras (risco específico).

Mas no laboratório de microbiologia alimentar os estudantes têm de contactar e conhecer os microrganismos do grupo 2, que serão manipulados sob supervisão directa do professor. As diferenças entre o nível de contenção 1 e 2 são mínimas e prendem-se apenas com a eventual produção de aerossóis durante as manipulações de material biológico.

2. REGRAS A OBSERVAR

Devem ser cumpridas as regras e adoptados os procedimentos e comportamentos que a seguir se indicam. Saliencia-se que uma técnica microbiológica correcta é fundamental para a segurança e não pode ser substituída por equipamento especializado, o qual apenas a pode complementar.

2.1. Acesso ao Laboratório

O acesso ao laboratório de microbiologia é restrito às pessoas qualificadas para o efeito, que incluem os estudantes / formandos, apenas durante os períodos de aulas previstos.

2.2. Higiene e protecção individual

No laboratório é **obrigatório** o uso de **bata**. Esta deve ser comprida, limpa, de cor clara e devidamente ajustada ao corpo. De preferência deverá ser de algodão (fibras sintéticas representam risco de incêndio), aberta ao lado mas bem sobreposta e deve apertar de preferência com molas. A bata protege o operador e o seu vestuário de eventuais contaminações. Idealmente a bata deverá ser usada apenas no laboratório de microbiologia, sendo vestida à entrada e despida sempre que saia. Desta forma além de proteger o aluno, a bata minimiza o transporte de microrganismos do laboratório para o exterior e exteriores para o laboratório, permitindo a manutenção de uma baixa carga contaminante e evitando também a propagação indesejável no exterior dos microrganismos manipulados no laboratório.

Não é permitido o uso da **bata desabotoada** nem de peças de vestuário soltas, como lenços de pescoço ou gravatas soltas. Além do risco de contaminação e da movimentação excessiva de ar que provocam, a sua eventual inflamação nos bicos de gás poderá ter consequências desastrosas.

Deve **prender-se o cabelo comprido**, antes de entrar no laboratório, de modo a evitar contaminações e riscos de incêndio.

Não se devem usar ornamentos tais como anéis, pulseiras ou relógios de pulso.

Devem **lavar-se bem as mãos** e os pulsos, com abundante água e sabão, **antes e depois** de executar o trabalho e sempre que manuseie material contaminado. Esta operação permite minimizar contaminações cruzadas.

Para manipular microrganismos dos grupos 1 e 2 não é necessário o uso de luvas a não ser que tenha feridas ou outras lesões cutâneas.

Durante a sementeira/inoculação deve evitar circulação de ar, falar, tossir ou espirrar sobre o material de trabalho.

Não deve levar nada à boca, incluindo lápis, selos, rótulos ou mesmo as mãos.

É expressamente **proibido comer, beber, fumar, mascar pastilha elástica, maquilhar-se e pôr lentes de contacto durante um trabalho laboratorial.**

Sobre qualquer derrame, acidente, exposição efectiva ou potencial a materiais infecciosos **deve ser feita notificação imediata ao professor.** Líquidos ou outro material infectado, inadvertidamente transferidos para fora dos contentores a que se destinam deverão ser de imediato desinfectados com o apoio do professor. Lave muito bem e desinfecte as mãos após qualquer acidente laboratorial.

2.3. Bancadas de trabalho

As bancadas devem estar arrumadas e livres de quaisquer objectos que não sejam necessários ao trabalho a desenvolver.

As superfícies de trabalho devem ser **SEMPRE descontaminadas antes e depois do trabalho** assim como depois de qualquer incidente com material potencialmente contaminado. Previne a contaminação do seu trabalho com microrganismos de aulas anteriores, e evita a propagação dos microrganismos com que operou. Especial atenção deve ser dada aos equipamentos de uso comum, (ansas, pinças, microscópio e bancada) para que os diferentes grupos o encontrem limpo e pronto a usar.

3. TÉCNICAS DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Todos os procedimentos técnicos devem ser realizados de forma a minimizar a formação de aerossóis ou salpicos.

É proibido pipetar à boca, devendo ser utilizados auxiliares de pipetagem.

Todas as pipetas devem ser colocadas nos contentores com desinfectante e ter protecção de algodão hidrófobo na extremidade, para reduzir o risco de contaminação.

Podem também ser usadas micropipetas em casos especiais

Nunca deve borbulhar ar dentro de um líquido que pode conter microrganismos ou substâncias tóxicas pelo risco de provocar aerossóis ou derramames.

Um operador pouco experiente deve ter um pedaço de algodão embebido em desinfectante, para limpar imediatamente as gotas de líquido contaminado que possam cair acidentalmente da pipeta.

As pipetas ou pontas contaminadas devem ser imediatamente colocadas em recipientes de plástico próprios, tendo em vista a descontaminação e remoção adequadas posteriormente.

Sempre que possível devem ser utilizadas ansas descartáveis.

O teste da catalase não deve ser feito em lâmina. As técnicas mais seguras são:

- em tubo de hemólise
- em placa tapada
- directamente sobre a colónia com uma pipeta de Pasteur

3.1. Remoção de resíduos

O manuseamento de resíduos de laboratório deve efectuar-se de acordo com a legislação vigente. Nos laboratórios a descontaminação e a remoção de resíduos são operações interligadas. Do material reagentes e meios de cultura que diariamente são utilizados apenas alguns são para eliminar. Outros como material de vidro e utensílios são reutilizáveis e têm que ser descontaminados.

A descontaminação e remoção de resíduos é regulada pelo Despacho 242/96 – DR II série nº187 de 13 de Agosto e divide-os em 4 grupos:

Resíduos do Grupo I – equiparados a urbanos - Saco preto (resíduos administrativos, - lixo comum).

Resíduos do Grupo II – resíduos hospitalares não perigosos, equiparados a urbanos - Saco preto (invólucros de pipetas, papéis etc.).

Resíduos do Grupo III – resíduos de risco biológico - Autoclavagem: - Saco branco com símbolo de risco biológico (material reutilizável que vai depois ser lavado preparado e novamente esterilizado na zona limpa para posterior uso e meios de cultura não tóxicos).

Resíduos do Grupo IV – resíduos específicos - Incineração - saco vermelho (produtos químicos e material perfurante (contentores rígidos), meios de cultura potencialmente tóxicos).

Durante as aulas práticas de microbiologia alimentar são originados resíduos do grupo II e III.

Os resíduos do grupo II são colocados nos caixotes do lixo.

Os frascos e tubos reutilizáveis, contendo material contaminado, são colocados no contentor adequado para posterior remoção e esterilização. O material descartável será colocado em contentor separado para resíduos do grupo III.

3.2.Livros e cadernos

Só é permitido ter na bancada durante a execução do trabalho prático o material de apoio estritamente indispensável à sua execução, como o protocolo experimental e um lápis. Todos os restantes pertences como pastas, casacos ou sacos deverão ser acondicionados em local próprio, antes de iniciar o trabalho prático.

Controlo microbiológico de superfícies

1. INTRODUÇÃO

Os géneros alimentícios sofrem, durante o seu processamento, manipulação e transporte, contacto com diferentes tipos de superfícies - equipamentos, utensílios, mãos, embalagens, etc. - mais ou menos contaminadas com microrganismos. As contaminações microbiológicas daí resultantes assumem, frequentemente, grande relevância. O elevado número de microrganismos que podem transmitir aos alimentos e a sua natureza podem conduzir a graves consequências, quer em termos de saúde pública, quer em termos de deterioração futura dos alimentos. Não admira, pois, que o controlo microbiológico de superfícies assuma um papel determinante em tecnologia alimentar e constitua um dos melhores meios para testar a eficácia das operações de lavagem e desinfecção de uma unidade industrial e a higiene pessoal dos operários.

Para recolher os microrganismos presentes nas superfícies a analisar recorre-se usualmente a dois métodos: 1) de soluções de enxaguamento e 2) de superfícies de contacto. Nas superfícies de contorno e acesso difícil (cantos, fendas, utensílios) recorre-se, ao método de contacto de zaragatoas de algodão hidrófilo, lã de alginato ou gaze, humedecidas numa solução isotónica ou meio de cultura apropriados. Há, no entanto, outros métodos para pôr em evidência a presença de microrganismos nas superfícies planas, como seja o método de contacto por réplica de agar (RODAC) em que se faz contactar directamente a superfície dum meio de cultura sólido contido numa placa de petri, com a superfície a analisar (para superfícies pouco contaminadas). Nos métodos de soluções de enxaguamento, as células fixadas à superfície são removidas com uma solução estéril de baixa tensão superficial (conveniente para superfícies de difícil acesso). Para superfícies pouco contaminadas, facilmente preserváveis do ar, como o interior de garrafas de vidro, recorre-se ao método de contacto superficial por rolamento, em que se aplica um meio de cultura (sólido) liquefeito directamente sobre a superfície a analisar.

Neste trabalho prático executar-se-ão as técnicas referidas e enumerar-se-ão os microrganismos aeróbios mesófilos "totais" e coliformes nas amostras recolhidas.

2. OBJECTIVO

As técnicas descritas neste protocolo tem por objectivo o controlo microbiológico de superfícies através da utilização das técnicas de enxaguamento e de contacto.

3. MATERIAL

- 1 - Meios de cultura: Agar nutritivo e VRBA (Anexo)
- 2 - Solução de Ringer
- 3 - Solutos de Calgon-Ringer (Ringer + 1% de hexametáfosfato de sódio ou citrato de sódio)
- 4 - Zaragatoas de lã e de alginato, esterilizadas
- 5 - Placas metálicas de 1, 10 e 100 cm² esterilizadas
- 6 - Placas de Petri, esterilizadas
- 7 - Pipetas de 1 e 10 ml esterilizadas
- 8 - Estufa a 30°C
- 9 - Facas e tesoura, esterilizadas

4. PROCEDIMENTO

4.1. Método de contacto por zaragatoa

1 - Delimitar com a placa a área a analisar. Com a zaragatoa, previamente humedecida no diluente estéril, esfregar, cuidadosamente toda a superfície e transferir assepticamente a zaragatoa para o tubo de ensaio. Para isso, corte a vara de zaragatoa com uma tesoura esterilizada e deixe-a cair para dentro do tubo que contém o soluto Calgon-Ringer. Agite o tubo até à completa dissolução de lã de alginato.

2 - Proceder à preparação das diluições e sementeiras (protocolo da avaliação dos microrganismos totais).

3 - Colocar na estufa a 30°C as placas semeadas, 3 dias para os microrganismos aeróbios mesófilos "totais" e 48 h para os coliformes.

4.2. Método de contacto por réplica de agar

1 - Escolher a área a analisar.

2 - Remover a tampa da placa. Premir cuidadosamente a superfície do agar sobre a área a analisar. Certifique-se de que toda a superfície do menisco de agar contacta com a área que seleccionou para análise.

3 - Colocar as placas na estufa a 30°C durante 3 dias para os microrganismos aeróbios mesófilos "totais" e 48h para os coliformes.

4.3. Método de contacto por rolamento

1 - Escolher as garrafas a analisar.

2 - Verter o meio de cultura liquefeito para dentro da garrafa, em seguida aplicar movimentos rotativos à garrafa, de modo a que o meio se distribua uniformemente pela parede interna da garrafa. Logo depois, passar a garrafa por um banho de água fria e deixar solidificar.

3 - Após a solidificação do meio de cultura, colocar as garrafas na estufa a 30°C durante 3 dias para a pesquisa dos microrganismos aeróbios mesófilos "totais" e 48 h para os coliformes.

4.4. Método de soluções de enxaguamento

Elabore o procedimento que considera necessário para aplicar este método ao controlo microbiológico da superfície que lhe for fornecida para análise.

5. TEMAS PARA DISCUSSÃO

1. Qual a técnica que utilizaria no controlo microbiológico dos bicos de uma máquina de enchimento de vinhos.

2. Compare as vantagens e inconvenientes das zaragatoas de algodão, gaze hidrófila e lã de alginato.

3. As zaragatoas de algodão hidrófilo têm o inconveniente de fixar uma parte dos microrganismos recolhidos das superfícies a analisar, conduzindo a contagens por defeito. Elabore um protocolo de ensaio que permita quantificar a percentagem de microrganismos retido pelas zaragatoas de algodão.

4. Acha que o método de controlo utilizado pode influenciar de modo significativo os resultados obtidos?

6. RESULTADOS

Preparação de amostras para análise microbiológica

1. INTRODUÇÃO

Os métodos usados para o isolamento e contagem de microrganismos presentes em alimentos sólidos ou pastosos exigem o tratamento prévio da amostra, de forma a transferir para uma fase líquida (geralmente uma solução isotónica, designada diluidor) os microrganismos presentes no seu interior ou aderentes à sua superfície. Há pois que garantir uma homogeneização correcta da amostra, que é feita, normalmente, por processos mecânicos.

O procedimento mais vulgarmente utilizado consiste na trituração da amostra na presença do diluidor, recorrendo-se, para tal, a trituradores eléctricos munidos de hastes com pás que giram a alta velocidade. Tal procedimento, ainda que prático e eficiente em termos de homogeneização, não é totalmente correcto do ponto de vista microbiológico. Por um lado, porque a acção mecânica violenta que é exercida sobre a amostra a analisar, pode provocar o seu aquecimento e, conseqüentemente, afectar a flora microbiana presente. Por outro, porque pode fragmentar estruturas filamentosas dos microrganismos (hifas de fungos, bactérias agrupadas, pseudomicélio de leveduras, etc.), conduzindo a resultados por excesso. Este procedimento é desaconselhado em amostras que contêm microrganismos patogénicos, devido à formação de aerossóis.

Para limitar as variações dos resultados, tornando-os minimamente reprodutíveis, é necessário que as condições de homogeneização sejam normalizadas. Ainda que tais parâmetros possam variar um pouco com o tipo de alimento a analisar, a experiência mostra que a velocidade do triturador deve estar compreendida entre 8000 e 45000 r.p.m. e o tempo de homogeneização ser o suficiente para se conseguir um total de 15-20000 rotações.

No sentido de ultrapassar os inconvenientes da homogeneização por trituração desenvolveu-se, posteriormente, um outro processo mecânico, mais suave, em que a amostra é sujeita a um batimento dentro de um saco esterilizado, preparado para o efeito na presença do agente diluidor. Ainda que tal processo evite os inconvenientes atrás referidos, não permite uma homogeneização tão perfeita da amostra em determinados alimentos sólidos, obrigando o analista a ponderar, cuidadosamente, a sua escolha.

Outro factor de grande importância a considerar na preparação da amostra para análise microbiológica, tem a ver com o agente diluidor a utilizar. Muitos dos agentes habitualmente utilizados - soluções salinas, solução de Ringer, tampão fosfato, água destilada ou água peptonada - podem ser tóxicos para alguns microrganismos, particularmente se se prolonga de forma excessiva o seu tempo de contacto. Os vários estudos que têm sido realizados nesta perspectiva, têm mostrado que os agentes diluidores mais adequados são os que contêm 0,1% de peptona em água destilada ou em solução salina. Para análises especiais, contudo, pode ter de se usar diluidores específicos, como acontece no caso das bactérias halófilas ou outros microrganismos osmófilos.

2. OBJECTIVO

O presente protocolo destina-se a fixar o processo de suspender e homogeneizar os alimentos sólidos (e as gorduras alimentares) num agente diluidor, de forma a suspender para uma fase líquida, os microrganismos que contêm.

3. MATERIAL

3.1. Alimentos sólidos

1. Balança (sensibilidade - 0,1 g).
2. Faca, pinça e tesoura esterilizadas.
3. Provetas graduadas de 50 ml esterilizadas.
4. Frasco de vidro com tampa roscada de 125 ml, esterilizado.
5. Marcador para vidro.
6. Homogeneizador apropriado (frasco com pérolas; almofariz; blender; Stomacher).
7. Diluentes: solução de triptona sal (diluyente genérico); solução de Ringer (diluyente para leite e produtos lácteos); água peptonada tamponada (diluyente para produtos à base de ovo). A composição e preparação são descritas em anexo.

3.2. Gorduras alimentares

1. Balança (sensibilidade-0,1 g).
2. Banho-maria a $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
3. Diluyente (solução de Ringer a 1/4 ou tampão fosfato). A composição e preparação é descrita em anexo.

4. Pipetas graduadas de 10 ml divididas em décimos, esterilizadas.
5. Espátula esterilizada.
6. Frasco com pérolas de vidro esterilizado.
7. Centrífuga.
8. Tubos de centrífuga.

4. PROCEDIMENTO

4.1. Alimentos sólidos

1. Tarar o saco
2. Pesar para dentro do saco, assepticamente, a quantidade de amostra necessária, segundo as normas portuguesas para cada produto (10 g é o mais usual (ICMSF, 1983)). No caso de não haver norma portuguesa, adoptar critério semelhante ao existente numa norma para um produto do mesmo tipo.
3. Juntar, assepticamente, o volume do diluidor necessário para obter uma diluição de 1/10 (p/v). Utilizar para tal uma proveta graduada esterilizada.
4. Colocar a amostra no homogeneizador. A velocidade de homogeneização não deve ultrapassar as 45000 r.p.m. e o tempo de homogeneização deve ser o suficiente para se obter um total de 15-20000 rotações. No caso de se utilizar um homogeneizador do tipo "Stomacher" a duração da homogeneização será de 60 segundos a uma velocidade de 230 r.p.m.
5. Deixar em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos.
6. Após o período de repouso, proceder, com brevidade, às diluições necessárias para as diferentes análises e, logo em seguida, às sementeiras.

4.2. Gorduras alimentares

1. Tarar o frasco.
2. Pesar ou pipetar (a pipeta deve estar aquecida a 45°C) para o frasco, assepticamente, a quantidade necessária de gordura (ver Norma Portuguesa do produto).
3. Juntar, assepticamente o volume de diluidor na proporção de 9 vezes a do produto. É conveniente que o diluidor esteja a uma temperatura superior à do ambiente.
4. Colocar o frasco em banho-maria (42±0,5°C). Agitar o frasco periodicamente durante 30-60 minutos.
5. Proceder com a brevidade desejada às diluições necessárias para a análise microbiológica.

Se pretender realizar a análise num volume conhecido da fase aquosa deverá seguir o seguinte procedimento, após a liquefação da gordura.

1. Transferir, assepticamente, o conteúdo do frasco para tubos de centrífuga.
2. Centrifugar a 5 000 r.p.m. durante 25 minutos.
3. Decantar a gordura sobrenadante.
4. Juntar à fase aquosa mais diluidor na mesma proporção.
5. Repetir o ponto 2.
6. Recolher a fase aquosa com uma pipeta e medir o volume obtido com uma proveta graduada. Registrar este valor.
7. Proceder imediatamente à análise microbiológica.

5. TEMAS PARA DISCUSSÃO

1. Proponha um esquema para avaliar a eficácia da homogeneização, segundo a metodologia utilizada.
2. No caso de preparação de uma amostra para contagem de microrganismos filamentosos, qual o processo de homogeneização que escolheria? Justifique.
3. A que cuidados deve atender quando faz uma amostragem, para que esta seja representativa do produto a analisar?

6. RESULTADOS

Enumeração de Microrganismos Aeróbios "Totais"

1. INTRODUÇÃO

A determinação da flora microbiana "total" de um produto alimentar continua a ser o meio mais correntemente usado para avaliar a sua qualidade microbiológica. Não admira, pois, que tanta atenção tenha sido e continue a ser dedicada à sua determinação, quer pelo método clássico da enumeração em placas (descrito neste protocolo), quer pelos mais modernos métodos instrumentais de análise microbiológica como a impedimetria, luminometria, microcalorimetria, radiometria, redução de corantes, etc..

A flora microbiana "total" caracteriza, em termos microbiológicos, as condições de manipulação, o estado de alteração ou o grau de frescura da maioria dos alimentos podendo, em certos casos, servir de medida da sua qualidade sanitária.

Não obstante as limitações inerentes ao princípio do método em que se baseia a enumeração das células viáveis em placa (ver 3.) e a relatividade do termo "total", fortemente dependente das condições ambientais em que ocorre a incubação das amostras, este indicador continua a ser extremamente útil na avaliação da qualidade dos alimentos, como o comprova a relação existente entre a carga microbiana "total" e os sinais organolépticos de deterioração (Fig: 1.):

10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
	a		b	c	d	e	

Fig. 1 - Significado da contagem de células viáveis "totais" em produtos alimentares relativamente ao seu uso como indicador de deterioração. (a) A deterioração não é geralmente detectável, com possível excepção de leite cru que pode acidificar na gama de 10^5 - 10^6 . (b) Alguns produtos alimentares mostram princípios de deterioração, como acontece em produtos cárneos embalados no vácuo, que já sofrem alteração do aroma e podem estar alterados. (c) Aromas conservados em condições aeróbias. (d) A maioria dos produtos alimentares denotam indícios evidentes de deterioração; um aspecto mucoso é perceptível nos vegetais e a "morrinha" é típica nas carnes. (e) Evidentes alterações estruturais são observáveis em todos os produtos alimentares (adaptação de Jay, 1986).

2. OBJECTIVO

O presente protocolo tem por objectivo a avaliação da flora microbiana "total" num produto alimentar pelo método de contagem em placas.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Este método baseia-se no princípio de que cada célula bacteriana presente numa amostra a analisar origina uma colónia individualizada e visível, após inoculação e incubação a uma temperatura e num meio de cultura sólido apropriados.

A distinção entre microrganismos mesófilos, psicrotróficos e termófilos é feita com base no princípio de que a temperatura e o tempo de incubação ideais para cada grupo impede o desenvolvimento de colónias de microrganismos dos restantes grupos. Por convenção as temperaturas e tempos ideais são de 30°C e 72 h, 6,5°C e 10 dias e 55°C e 48 h, respectivamente para os microrganismos mesófilos, psicrotróficos e termófilos.

4. MATERIAL

4.1. Microrganismos Aeróbios Mesófilos

1 - Diluente: solução de triptona sal (diluente genérico); solução de Ringer (diluente para leite e produtos lácteos); água peptonada tamponada (diluente para produtos à base de ovo). A composição e preparação são descritas em anexo.

2 - Meio de cultura: Triptona-glucose-extracto-agar (a composição e preparação são descritas em anexo). Para contagem de microrganismos "totais" em leites ou produtos lácteos, junta-se ainda a este meio 1g de leite em pó desnatado, isento de substâncias inibidoras.

3 - Estufa a 30°C.

4 - Pipetas de 1 e 10 ml, esterilizadas (boca larga).

5 - Placas de Petri esterilizadas.

6 - Tubos de ensaio esterilizados contendo 9 ml do diluente escolhido conforme a natureza do produto.

7 - Frascos de 125 ml e 250 ml esterilizados.

8 - Homogeneizador.

4.2. Microrganismos Aeróbios Psicotróficos

O material necessário para a contagem de microrganismos psicotróficos em géneros alimentícios e alimentos para animais é o mesmo que para a contagem de microrganismos mesófilos, à excepção de ser ainda necessário:

- Estufa a $6,5 \pm 0,5$ °C.

- Solução de trifeniltetrazólio TTC (a composição e preparação são descritas em anexo).

4.3. Microrganismos Aeróbios Termófilos

O material necessário para a contagem de microrganismos termófilos em géneros alimentícios e alimentos para animais é o mesmo que se utiliza para a contagem de microrganismos mesófilos, à excepção de ser ainda necessário:

- Estufa a 55°C.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Microrganismos Aeróbios Mesófilos

1 - Colher a amostra para análise microbiológica. Deve ter em atenção que a execução deste passo está normalizada (NP-1828) e que deve consultar a Norma referente a cada produto a analisar.

2 - Homogeneizar a amostra seguindo os sucessivos passos do trabalho prático Nº 1.

3 - Após a homogeneização da amostra com o diluente proceder à preparação das diluições decimais. Para tal, retirar assepticamente 1 ml da amostra para o primeiro tubo de ensaio com o soluto diluidor (9 ml). Com uma nova pipeta homogeneizar este tubo, retirar assepticamente 1 ml da diluição e transferir para novo tubo de ensaio.

Proceder do mesmo modo até obter a desejada gama de diluições.

4 - Depois de obter todas as diluições necessárias proceder, imediatamente à sementeira. Para isto, homogeneize o tubo de ensaio da última diluição e retire assepticamente 1 ml. Transfira-o para uma placa de Petri esterilizada, devidamente identificada.

Repita esta operação para todas as outras diluições, por ordem decrescente e com brevidade.

5 - Terminada a distribuição do inóculo pelas placas de Petri, verter para cada uma das placas, assepticamente, 15 ml do meio de cultura e de imediato. Empurre a placa no sentido vertical para a frente e para trás 5 vezes. Rode a placa no sentido dos ponteiros do relógio 5 vezes. Agite a placa da esquerda para a direita 5 vezes. Rode a placa no sentido contrário aos ponteiros do relógio 5 vezes. Deve ter em atenção que o período que medeia o início da preparação das diluições e o fim das sementeiras não deve ultrapassar os 15 minutos.

6 - Após a solidificação do meio de cultura colocar as placas em posição invertida, na estufa (30°C).

7 - Observe as placas após 48 h, e 72 h, seleccionando aquelas que apresentam mais de 30 e menos de 300 colónias (placas contáveis).

8 - Apresente o número de microrganismos mesófilos no produto analisado por unidade de volume (no caso de suspensões de culturas bacterianas e alimentos líquidos) de peso (alimentos sólidos) e de área (superfície).

5.2. Microrganismos Aeróbios Psicotróficos

1 - Proceder como em 5.1. Contudo no passo 5, pode adicionar nas placas de Petri, ao distribuir o meio, 2 gotas da solução de trifeniltetrazólio (TTC). Este reagente facilita a observação das colónias.

2 - No passo 6 as placas são colocadas na estufa a 6,5°C.

3 - A contagem das colónias realiza-se ao fim de 10 dias.

4 - Terminado o período de incubação das placas, proceder à contagem das colónias nas placas de petri "contáveis" (que apresentam entre 30 e 300 colónias).

5 - Apresente o número de microrganismos aeróbios psicotróficos no produto analisado, de acordo com o especificado no ponto 5.1.8.

5.3. Microrganismos Aeróbios Termófilos

1 - Proceder tal como em 5.1. à excepção do passo 6. Após a solidificação do meio de cultura isole as placas com fita gomada. Este procedimento evita a desidratação do meio de cultura durante a incubação das placas na estufa. As placas depois de isoladas são colocadas na estufa (55°C), em posição invertida. A duração da incubação é de 48 horas.

3 - Terminado o período de incubação proceder à contagem das colónias.

4 - Apresente o número de microrganismos aeróbios termófilos no produto analisado, de acordo com o especificado no ponto 5.1.8.

7. TEMAS PARA DISCUSSÃO

1. Justifique as razões que levam a maioria dos microbiologistas a utilizar aspas quando se referem a microrganismos "totais".
2. Em que tipo de alimentos não é lícito utilizar os "microrganismos aeróbios totais" como índice da sua qualidade microbiológica? Justifique.
3. A contagem de microrganismos aeróbios psicotróficos viáveis é um bom indicador para prever a data de validade (shelf-life) de que alimentos?

8. RESULTADOS

Pesquisa de bactérias coliformes e pesquisa provável de *Escherichia coli* de origem fecal

1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista microbiológico, a primeira condição a que um género alimentício deve obter é **ser inócuo**, isto é, não conter microrganismos susceptíveis de pôr em causa a saúde dos consumidores. É, pois, natural que a análise microbiológica dos alimentos vise, prioritariamente, avaliar a sua inocuidade. Tal tarefa, é contudo, difícil e algo controversa, apesar do grande avanço científico e tecnológico que os métodos de análise microbiológica registaram nos últimos anos. Com efeito, a detecção e enumeração dos microrganismos patogénicos continua a apresentar dificuldades. A presença destes microrganismos nos alimentos em pequenas quantidades (normalmente), a especificidade e complexidade de análise a que a identificação de cada espécie obriga, o tempo de resposta das análises e os custos envolvidos são, de facto, razões consideráveis que tornam pouco prática a pesquisa e enumeração de patogénicos em rotina, quer na indústria, quer mesmo, na certificação.

Como solução alternativa utilizam-se, geralmente, métodos indirectos de pesquisa da inocuidade dos alimentos. Alguns, como os descritos neste protocolo, baseiam-se no facto da maioria das toxinfecções alimentares ter origem entérica e, conseqüentemente, ser a contaminação fecal um forte indício da eventual presença de microrganismos patogénicos.

A pesquisa de contaminação dos alimentos faz-se através da detecção e/ou enumeração de microrganismos hóspedes habituais do intestino, como sejam as bactérias coliformes, que se encontram em grande número nas fezes. O termo coliformes inclui a *Escherichia coli* e várias espécies de outros géneros da família *Enterobacteriaceae* (ICMSF, 1983). A possibilidade de grande número das bactérias detectadas como coliformes não ter, necessariamente, uma origem entérica faz com que seja especialmente útil pesquisar, dentro deste grupo, os de origem fecal. Estas distinguem-se facilmente das coliformes não fecais pela faculdade que têm de crescer a temperaturas de incubação compreendidas entre 44-46°C. Porém, mesmo a estas temperaturas, há alguns géneros que são detectados e que não são de origem fecal, como o *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. A pesquisa de *E. coli*, única espécie de origem predominantemente fecal, detectada pelo teste de coliformes, torna-se, por conseguinte, muito útil. Para este propósito utiliza-se o conhecido teste IMViC, onde (I) representa o teste de pesquisa de produção de indol, (M) o teste ao vermelho de metilo, (Vi) a produção de acetoina (o teste de Voges-Proskauer) e (C) a utilização do citrato. Os resultados, de *E. coli*, deverão ser:

I M Vi C
+ + - -

A norma portuguesa de pesquisa de *E. coli* em géneros alimentícios e alimentos compostos para animais (NP-2308) simplifica ainda este teste reduzindo-o à pesquisa de indol.

Consideramos portanto, ser mais correcta a designação pesquisa provável de *Escherichia coli* em vez do título que a norma NP-2308 refere.

NOTA 1: Pelo facto de haver géneros de *Enterobacteriaceae* (e.g. *Salmonella* e *Shigella*), que sendo predominantemente de origem fecal e também enteropatogénicas para o homem, não são detectadas pelo teste dos coliformes, prevê-se que num futuro próximo este teste seja substituído pelo teste de estimativa de *Enterobacteriaceae*.

2. OBJECTIVO

Os métodos descritos neste protocolo têm por objectivo pesquisar indícios de contaminação fecal em géneros alimentícios através da utilização de um indicador de origem entérica.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Explorar a capacidade que os coliformes têm de fermentar a lactose, com formação de gás, num meio selectivo contendo bÍlis de boi e verde brilhante.

A distinção entre coliformes totais e fecais baseia-se na capacidade que só estes últimos têm de no referido meio fermentar a lactose a 44-46°C.

A pesquisa provável de *E. coli* faz-se, através da realização do teste da produção do indol (ver 1.) sobre as diluições positivas dos testes anteriores.

4. MATERIAL

4.1. Pesquisa de coliformes

- 1 - Amostra a analisar.
- 2 - Meios de cultura: Caldo Lactosado de concentração simples e dupla; Caldo de BÍlis e Verde Brilhante (CBVB) (a composição e preparação são descritas em anexo).
- 3 - Diluente: Solução Triptona - sal; Solução de Ringer a 1/4.
- 4 - Pipetas de 1 e 10 mL esterilizadas (pipetas de boca larga para suspensões com alimentos de difícil sucção).
- 5 - Frascos de 125 mL com tampa roscada, esterilizados.
- 6 - Tubos de ensaio com 9 mL da solução Triptona - sal.
- 7 - Homogeneizador.
- 8 - Estufa a 30°C.
- 9 - Ansa de platina.
- 10 - Tubos de ensaio de 16x160 mm e de 20x200 mm.

4.2. Pesquisa provável de *E. coli* de origem fecal

- 1 - Meios de cultura: Caldo de BÍlis e Verde Brilhante; Água Peptonada (AP) (Anexo).
- 2 - Os tubos positivos de Caldo de BÍlis e Verde Brilhante (ver 5.1., ponto 8).
- 3 - Pipetas de Pasteur.
- 4 - Tubos de ensaio de 16X160 mm.
- 5 - Reagente de Kovac (Anexo).
- 6 - Estufa a 44,5±0,5°C.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Pesquisa de coliformes

- 1 - Colher a amostra para análise microbiológica.
- 2 - Homogeneizar a amostra, seguindo o processo descrito no protocolo do trabalho prático Nº 1.
- 3 - Preparar as diluições da amostra para análise microbiológica.
- 4 - Após a preparação das diluições proceder à sementeira. Para tal, semear 10 mL da suspensão-mãe; ou da amostra para análise se o produto é líquido, no tubo com meio de dupla concentração de Caldo Lactosado (C.L.) e 1 mL da mesma suspensão e de todas as diluições, em tubos de C.L. de concentração simples.
- 5 - Incubar os tubos semeados a 30°C, durante 48h.
- 6 - Terminado o período de incubação, retirar os tubos da estufa e de cada tubo "positivo" (apresentam turvação, mesmo ténue), transferir cerca de 0,1 mL (± 3 gotas) para um tubo de meio selectivo (CBVB).
- 7 - Proceder como em 5.
- 8 - Terminado o período de incubação, retirar os tubos da estufa e proceder à leitura. Consideram-se positivos os tubos que apresentam turvação e formação de gás no tubo de Durham, devendo o gás atingir pelo menos um décimo da altura do tubo.
- 9 - Apresente os resultados da pesquisa de coliformes no produto analisado, indicando a mais alta diluição decimal do produto em que a pesquisa foi positiva e a mais baixa em que foi negativa.

5.2. Pesquisa provável de *E. coli* de origem fecal

- 1 - Repicar duas gotas de cada um dos tubos positivos de CBVB (ver 5.1. ponto 8) para um tubo de AP e um de CBVB.
- 2 - Incubar os tubos semeados, de ambos os meios, em estufa a 44,5±0,5°C durante 48h.
- 3 - Terminado o período de incubação proceder à leitura dos tubos. Para tal, juntar aos tubos de AP 0,5 mL de reagente de Kovac e agite. A formação de um anel vermelho revela a presença do indol. Os tubos de CBVB positivos são aqueles que apresentam turvação e gás no tubo de Durham. Reuna os resultados da leitura dos dois tubos e considere como resultado positivo:
Água Peptonada - **Presença de indol.**
Caldo de BÍlis e Verde Brilhante - **Turvação do meio e gás no tubo de Durham.**
- 4 - Apresente os resultados da pesquisa **provável** de *E. coli* de origem fecal no produto analisado, indicando a mais alta diluição decimal do produto em que a pesquisa foi positiva e a mais baixa em que foi negativa.

6. TEMAS PARA DISCUSSÃO

1. A enumeração de coliformes totais e/ou fecais em iogurtes é motivo de alguma controvérsia, dada a grande sensibilidade destes microrganismos aos valores baixos de pH. Indique em que condições será legítimo pesquisar coliformes nestes produtos. Justifique.
2. Para avaliar uma contaminação remota, com fezes, os coliformes totais serão um bom indicador? Justifique.

7. RESULTADOS

Pesquisa e estimativa do número de enterococos em alimentos

1. INTRODUÇÃO

A exemplo do que acontece com os coliformes, os enterococos também são utilizados em microbiologia alimentar como índice de contaminação fecal. Todavia, ao contrário dos coliformes, não são abundantes nas fezes humanas encontrando-se, preferencialmente, nas dos animais. Se a este facto associarmos uma origem fecal por vezes duvidosa, compreendemos a controvérsia que existe à volta da sua utilização e, por conseguinte, da sua vulgarização como indicador microbiológico dos alimentos. Este grupo de bactérias tem, no entanto, uma característica importante relativamente aos coliformes maior resistência a condições ambientais desfavoráveis - que lhe confere um maior período de sobrevivência sobre os alimentos, particularmente os mais hostis para os microrganismos, como os desidratados, salgados e congelados.

Os enterococos englobam um grupo de bactérias pertencentes ao género *Streptococcus* que são, muitas vezes, confundidos com os "estreptococos do grupo D".

Ainda que as opiniões variem acerca dos que são enterococos, considera-se que estão incluídos nos estreptococos do grupo D de Lancefield, que se caracterizam por possuírem como antigene específico o ácido teicóico e hidrolizarem a esculina na presença de bÍlis:

Estreptococos do grupo D de Lancefield - *Str. faecalis*, *Str. faecium*, *Str. durans*, *Str. avium*, *Str. bovis*, *Str. equinus*.

Enterococos - *Str. faecalis*, *Str. faecium*, *Str. durans*, *Str. avium*.

O *Streptococcus faecalis*, com as suas variedades *faecalis*, *liquefaciens* e *zymogenes*, é a única espécie que se apresenta associada a matérias fecais humanas, enquanto *Str. faecium* *Str. durans* se encontram preferencialmente nas dos suínos, *Str. avium* nas das aves, *Str. bovis* nas dos bovinos e *Str. equinus* nas dos equinos.

2. OBJECTIVO

Pesquisar a presença de enterococos em géneros alimentícios, através da utilização de meios selectivos.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Explorar a capacidade que os enterococos têm de crescer na presença de concentrações elevadas de azida de sódio e violeta de etilo, inibitórias para crescimento das bactérias gram-negativas e restantes gram-positivas.

4. MATERIAL

- 1 - Diluente: Solução Triptona-Sal.
- 2 - Meios de cultura: "Rothe" de concentração dupla e concentração simples e E.V.A. (Anexo).
- 3 - Frascos de 125 e 250 ml esterilizados.
- 4 - Facas, pinças, tesouras e espátulas esterilizadas.
- 5 - Pipetas de 1 ml e 10 ml esterilizadas.
- 6 - Tubos de ensaio com 9 ml do diluente.
- 7 - Homogeneizador.
- 8 - Tubos de ensaio de 16x160 mm e de 20x200 mm.
- 9 - Estufa a $37^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.
- 10 - Balança (sensibilidade - 01 g).

5. PROCEDIMENTO

- 1 - Colher a amostra para análise microbiológica.
- 2 - Homogeneizar a amostra seguindo o processo descrito no procedimento do protocolo do trabalho prático nº 1.
- 3 - Preparar as diluições da amostra para a análise microbiológica.
- 4 - Após a preparação das diluições proceder à sementeira. Para tal, semear 10ml da suspensão-mãe ou da amostra se o produto é líquido num tubo com meio de cultura "Rothe" de dupla concentração e 1 ml da mesma suspensão e de todas as diluições em tubos do mesmo meio de cultura, mas de concentração simples.

5 - Incubar os tubos semeados na estufa a 37°C durante 48h.

6 - Terminado o período de incubação, retirar os tubos e proceder à sua leitura. Considera-se como resultado positivo a presença de cultura mesmo ténue.

7 - Repicar 1 gota de cada tubo para um tubo com meio E.V.A.

8 - Incubar os tubos semeados na estufa a 37°C durante 48h.

9 - Após o período de incubação proceder à leitura.

Considerar como resultado positivo o aparecimento de uma pastilha branco anilada no fundo do tubo.

10 - Apresente o resultado da pesquisa de enterococos no produto analisado, indicando a mais alta diluição decimal positiva e a mais baixa em que foi negativa.

6. TEMAS PARA DISCUSSÃO

1. A análise microbiológica de águas minerais inclui, como regra, a contagem de coliformes e enterococos. Sabendo que ambos os indicadores visam o mesmo objectivo, justifique a razão de tal procedimento.

2. Na análise microbiológica de vários alimentos fermentados (por exemplo) não faz sentido pesquisar enterococos. Justifique.

3. Analise, comparativamente, os coliformes e os enterococos como indicadores microbiológicos da higiene dos alimentos.

7 . RESULTADOS

Contagem de bactérias sulfito-redutoras crescidas em anaerobiose.

1. INTRODUÇÃO

Os clostrídeos anaeróbios sulfito-redutores constituem um grupo de microrganismos utilizado em microbiologia alimentar como indicador microbiológico. O facto de serem hóspedes habituais do tracto intestinal das aves e dos mamíferos (10^4 a 10^6 ufc/g de fezes) e terem a capacidade de formar endósporos, faz com que sejam referidas como indicadores de contaminação fecal remota. Porém a sua ubiquidade, que torna possível o seu isolamento dos mais variados habitats (ar, pó, água, vegetais, carne, pescado, etc.), não permite afirmar que os alimentos de onde são isoladas tenham sofrido uma contaminação fecal, mesmo que remota.

Entre as bactérias sulfito-redutoras assume especial relevância a espécie patogénica *Clostridium perfringens* porque produz enterotoxinas. Esta bactéria anaeróbia é Gram+ e em condições favoráveis que não necessitam de um ambiente muito redutor (para um anaeróbio), tem um tempo de duplicação muito curto (inferior a 10 min.). A maioria dos alimentos de origem animal, como por exemplo a carne crua, tem um potencial de oxidação-redução (E_h) suficiente para permitir o seu crescimento. Elevadas contagens deste grupo de microrganismos, em que se inclui o *Cl. perfringens* podem indicar, para além de uma má qualidade microbiológica dos alimentos, um risco elevado para a saúde pública, devido à capacidade que esta bactéria tem de causar intoxicação alimentar e enterites necróticas. Por tal motivo, muitos países (E.U.A., Inglaterra, etc.) têm optado por privilegiar a pesquisa de *Cl. perfringens*, ainda que por vezes só presumptivamente, em vez das bactérias anaeróbias sulfito-redutoras (como acontece por exemplo entre nós e em França).

2. OBJECTIVO

A técnica descrita neste protocolo tem por objectivo contar as colónias de bactérias sulfito-redutoras em produtos destinados à alimentação humana e animal, através da utilização de um meio de cultura diferencial. Este método pode também permitir a enumeração de bactérias do género *Clostridium*.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método baseia-se no desenvolvimento de colónias da bactéria num meio de cultura sólido de baixo potencial de oxidação-redução (devido à presença de citrato de ferro). As colónias características de bactérias sulfito-redutoras apresentam-se negras como resultado da produção de sulfureto de ferro. Estas colónias após testes bioquímicos de confirmação permitem a identificação presuntiva das bactérias do género *Clostridium*.

4. MATERIAL

- 1 - Meio de cultura: Agar de sulfito de ferro (ASF)
- 2 - Diluente: Solução Triptonal sal e solução de Ringer a 1/4.
- 3 - Homogeneizador.
- 4 - Pipetas de 1 ml e 10 ml, esterilizadas.
- 5 - Sacos de Stomacher esterilizados.
- 6 - Facas, pinças e tesouras esterilizadas.
- 7 - Estufa a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$.
- 8 - Balança (sensibilidade 0,1g)

5. PROCEDIMENTO

- 1 - Colher a amostra para análise microbiológica.
- 2 - Homogeneizar a amostra seguindo o processo descrito no procedimento do protocolo do trabalho prático nº 1;
- 3 - Preparar as diluições para a análise microbiológica;
- 4 - Após a preparação das diluições transferir com uma pipeta estéril, 1 ml da amostra se o produto é líquido e das diluições, se o produto é sólido, para placas de Petri esterilizadas vazias;

- 5 - Deitar 15 ml do meio de cultura ASF liquefeito e arrefecido a 47°C e seguir cuidadosamente o método para a execução de placas de mistura. Deixar arrefecer e solidificar bem.
- 6 – Após solidificação completa, cobrir a superfície com uma camada de 10 ml do mesmo meio de cultura e deixar solidificar;
- 7 – Colocar as placas invertidas em jarras de anaerobiose. Ponha no seu interior o saco de papel contendo ácido ascórbico e carvão activado que irá reagir em contacto com o oxigénio do ar, produzindo CO₂ e reduzindo a quantidade de oxigénio presente a menos de 1%. Coloque também a tira de papel indicador de E_h e feche a jarra;
- 8 - Incubar a 37°± 1°C durante 24 a 48h. Caso se suspeite da presença de *Clostridia* termófilicos incubar também a 50°± 1°C durante 24 a 48h;
- 9 - Proceder à leitura e assinalar com auxílio de um marcador as colónias negras que vão aparecendo. Calcular o número de bactérias sulfito-redutoras em 1g ou mililitro do produto analisado, para os produtos sólidos e líquidos, respectivamente. Utilize para o efeito a Adenda aos protocolos dos trabalhos práticos nº 3, 6 e 8 referente à expressão dos resultados.

6. TEMAS PARA DISCUSSÃO

- 1 - Algumas especiarias são particularmente contaminadas com esporos de sulfito-redutores. Indique as principais razões que justifiquem tal contaminação.
- 2 - Como explica que a contagem de clostrídeos sulfito-redutores tenha mais interesse para avaliar a qualidade das águas do que dos alimentos.
- 3 - Porque razão se coloca uma outra camada sobre a superfície do agar de ASF após a execução da técnica de mistura.

7. RESULTADOS

Contagem de *Staphylococcus aureus* em géneros alimentícios

1. INTRODUÇÃO

A presença e proliferação de *Staphylococcus aureus* nos alimentos constitui um risco potencial para a saúde dos consumidores - homem ou animais - visto muitas estirpes produzirem enterotoxinas, que causam envenenamento alimentar quando ingeridas.

A pesquisa deste microrganismo justifica-se em algumas situações: a) confirmar a sua responsabilidade numa intoxicação alimentar; b) avaliar se um alimento ou ingrediente alimentar é uma fonte potencial de *Staphylococcus* enterotoxinogénicos; c) demonstrar a contaminação pós-processamento dos alimentos, devida a manipulação deficiente e/ou contacto com superfícies inadequadamente sanitizadas.

O *S. aureus* é um microrganismo muito frequente no homem, particularmente na pele (com acne), nariz, boca e à volta das feridas em cicatrização. É, pois, natural que uma das principais fontes de contaminação seja, directa ou indirectamente, a manipulação inadequada dos alimentos. A contaminação dos alimentos processados também pode ocorrer quando resíduos de alimentos se encontram nas superfícies do equipamento industrial. Deste modo, elevadas contaminações com *S. aureus* indicam que a sanificação, o controlo da temperatura, ou ambos, foram inadequados.

Nas matérias primas, particularmente de origem animal, a presença de *S. aureus* é comum e pode atingir elevados números, como acontece em leites mastíticos.

O significado da presença de *S. aureus* nos alimentos tem que ser encarado com prudência. Normalmente relaciona-se com a capacidade de certos tipos de *S. aureus* produzirem enterotoxinas quando existem condições para o seu crescimento. Em resultado de tais condições elevado número de *S. aureus* está presente nos alimentos. Esta presença não é, contudo, suficiente para incriminar o alimento como agente de envenenamento. Tal só é possível quando se demonstra a presença da toxina estafilocócica no alimento. A termoresistência desta toxina pode até levar a situações, em que não existam células viáveis de *S. aureus* num alimento e este poder provocar envenenamento. Nos alimentos onde um tratamento térmico posterior à produção da toxina, foi suficiente para destruir as células mas não destrói a toxina.

2. OBJECTIVO

A técnica descrita neste protocolo tem por objectivo contar células de *Staphylococcus aureus*, coagulase positivas mediante a utilização de meios selectivos e diferenciais.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Utilização de um meio selectivo de enriquecimento, com elevado teor de cloreto de sódio, e posterior repicagem para um meio de isolamento selectivo (pela presença de cloreto de lítio e de sulfametazina) e diferencial (devido à presença de gema de ovo e telurito de potássio). As colónias características apresentam-se negras e rodeadas por um halo transparente e dão quando confirmadas como de *S. aureus*, através da prova da coagulase uma reacção fortemente positiva.

4. MATERIAL

- 1 - Meio de cultura: "Chapman" (meio de enriquecimento); "Baird-Parker" (meio de isolamento); "B.H.I." (meio para pesquisa de coagulase) (Anexo).
- 2 - Diluente: Solução Triptona Sal; Solução de Ringer a ¼.
- 3 - Plasma de coelho.
- 4 - Facas, pinças, espátulas e tesouras, esterilizadas.
- 5 - Frascos de 250 ml esterilizados.
- 6 - Pipetas de 1 ml e 10 ml, esterilizadas.
- 7 - Pipetas de Pasteur.
- 8 - Placas de Petri.
- 9 - Estufa a 37°C.
- 10 - Homogeneizador.
- 11 - Solução de peróxido de hidrogénio a 3%.

12 - Lâminas de vidro.

13 - Tubos de 6 a 9 mm de diâmetro (tubos de hemólise), esterilizados.

5. PROCEDIMENTO

1. Colher a amostra para análise microbiológica.

2. Homogeneizar a amostra seguindo o processo descrito no procedimento do protocolo do trabalho prático nº 1.

3. Preparar as diluições da amostra para análise microbiológica.

4. Proceder à sementeira em meio de “Chapman” se o alimento é desidratado (gelatina, leite em pó ou alimento seco). Para isso retire 10 ml da suspensão-mãe ou da amostra, se o produto é líquido e transfira para 10 ml de meio de “Chapman” de dupla concentração. Retire também 1 ml da suspensão-mãe e das diluições para o mesmo meio mas de concentração simples. Se o alimento não se enquadra na categoria acima passe ao pnto 6.

5. Incubar os tubos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24- 48 h.

6. Transferir com uma pipeta 0,1 ml das diluições da amostra para uma placa de “Baird-Parker”. Espalhar o inóculo usando um semeador de vidro (espalhador), tendo o cuidado de não tocar nos bordos da placa. Proceda de igual modo para os tubos em que tenha havido cultura desenvolvida no meio de “Chapman” referido no ponto 4.

7. Incubar as placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 h.

8. Terminado o período de incubação verificar a presença de presumíveis colónias de *Staphylococcus*: estas colónias apresentam uma cor negra e com um precipitado branco rodeando um halo transparente.

As colónias com estas características são repicadas para tubos de meio “B.H.I.”. Ao repicar as colónias deve ter em atenção a sua identificação e por isso numerá-las previamente.

9. Incubar os tubos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h.

10. Após este período de incubação proceder à confirmação de *Staphylococcus* a partir do crescimento em cultura pura, por exame microscópico e pela pesquisa de catalase⁺.

11. No caso de confirmação de *Staphylococcus* provável, proceder à prova de coagulação. Para tal juntar 0,1 ml da cultura a 0,3 ml de plasma de coelho (fresco ou desidratado). Incubar a 37°C e verificar a formação de coágulo ao fim de 2-6h. Em caso de resultado negativo, prolongar a incubação até às 24h.

Considera-se resultado **positivo**¹ uando se obtém um **coágulo compacto** e **negativo** quando o **coágulo é pouco firme** (ver Fig. 1).

Desde que uma das colónias repicadas seja coagulase positiva fica confirmada a presença de *Staphylococcus aureus* no produto em análise.

12. Considerar como confirmadas as colónias de *Staphylococcus aureus* que apresentam a forma de cocos, catalase⁺ e coagulase⁺.

13. Apresente o resultado de pesquisa de *Staphylococcus aureus* no produto analisado, utilizando a adenda a este protocolo de trabalhos práticos para efectuar os cálculos.

¹ A norma portuguesa considera a reacção da coagulase positiva quando o coágulo é consistente (3^+ ou 4^+) e considera negativa quando o coágulo não é consistente ($-$; 1^+ e 2^+).

ANEXO A Reacção da coagulase

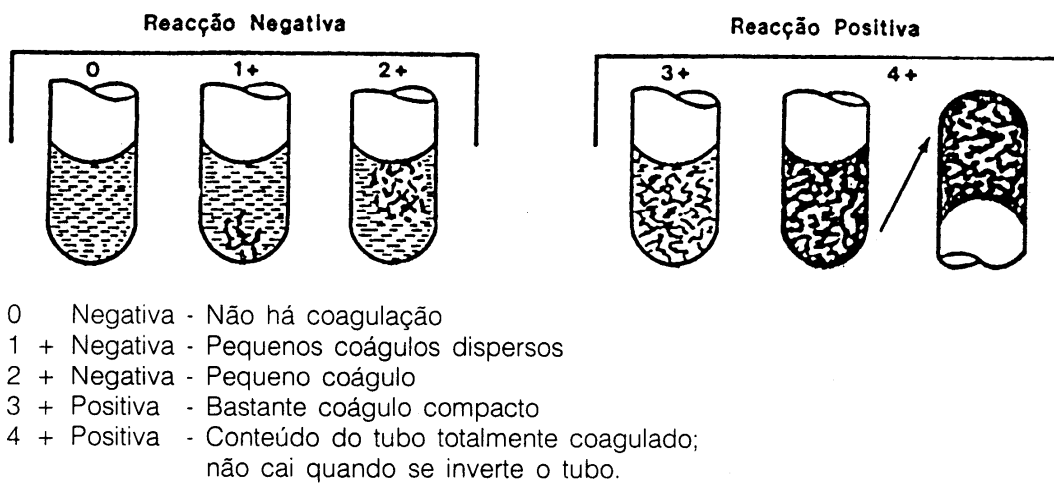


Figura 1- Resultados da prova da coagulase em plasma de coelho

6. TEMAS PARA DISCUSSÃO

1. A ausência de células viáveis de *S. aureus* num alimento é garantia da sua inocuidade relativamente à intoxicação estafilocócica? Justifique.
2. Qual o interesse do uso da gema de ovo no meio de Baird-Parker?

7. RESULTADOS

Pesquisa e enumeração de *Lactobacillaceae* em géneros alimentícios

1. INTRODUÇÃO

A família *Lactobacillaceae* agrupa um número de bactérias de grande importância em tecnologia alimentar, não só pelos processos fermentativos benéficos que asseguram, mas também pelos processos de alteração em que, por vezes, estão envolvidos. Justifica-se, por tal motivo, a sua pesquisa e/ou enumeração no acompanhamento de fermentações lácticas, ou para verificar a causa de determinadas alterações de alimentos, particularmente os de baixo pH.

2. OBJECTIVO

A técnica descrita neste protocolo tem por objectivo avaliar o número de bactérias da família *Lactobacillaceae* num produto alimentar, pelo método das placas.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Utilização de um meio de cultura propício ao crescimento de bactérias lácticas, com efeito selectivo, resultante da presença de acetato de tálio, e com efeito diferencial resultante da presença de cloreto de 2-3-5-trifenil-tetrazólio, que é responsável pela coloração rosada-vermelha que as colónias de *Lactobacillus* sp. adquirem.

4. MATERIAL

- 1 - Meio de cultura: M.R.S. gelosado.
- 2 - Solução de acetato de tálio a 5% e solução de trifeniltetrazólio a 1%.
- 3 - Diluente: Solução de ringer a ¼.
- 4 - Jarras de microaerofilia.
- 5 - Pipetas de 1 ml.
- 6 - Homogeneizador.
- 7 - Tubos de ensaio de 16x160 mm.
- 8 - Placas de Petri.
- 9 - Estufa a 30°C.
- 10 - Facas, pinças e tesouras esterilizadas.

5. PROCEDIMENTO

- 1 - Colher a amostra para análise microbiológica.
- 2 - Homogeneizar a amostra seguindo o processo descrito no procedimento do protocolo do trabalho prático nº 1.
- 3 - Preparar as diluições da amostra para a análise microbiológica.
- 4 - Após a preparação das diluições proceder à sementeira. Para isso, distribua 1 ml de cada uma das diluições da amostra, incluindo a suspensão-mãe por placas de Petri. Adicione o meio de M.R.S. gelosado ao inóculo. Aplique movimentos de transladação à placa de Petri de modo a que o inóculo se distribua uniformemente pelo meio de cultura. Deixar solidificar.
- 5 - Incubar as placas em jarra de microaerofilia a 30°C durante 3 dias.
- 6 - Terminado o período de incubação das placas, proceder à contagem das colónias nas placas de Petri "contáveis" (que apresentam entre 30 a 300 colónias).
- 7 - Apresente o número de *Lactobacillus* no produto analisado.

6. TEMAS PARA DISCUSSÃO

1. Qual o interesse das *Lactobacillaceae* como indicador microbiológico?
2. Indique grupos de alimentos onde se justifica a pesquisa de *Lactobacillaceae*.

7. RESULTADOS

Detecção de *Listeria monocytogenes*

1. DOMÍNIO DE APLICAÇÃO

A presente norma ISO 11290 descreve um método horizontal para a detecção de *Listeria monocytogenes*, sendo aplicável aos produtos alimentares destinados ao consumo humano ou à alimentação animal.

2. DEFINIÇÕES

São aplicáveis as definições:

- *Listeria* spp - microrganismos formadores de colónias num meio sólido selectivo e que apresentam as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas descritas conforme esta norma.
- *Listeria monocytogenes* – espécie de *Listeria* considerada como patogénica e que pode ser diferenciada das outras espécies não patogénicas devido às suas características bioquímicas específicas.

3. PRINCÍPIO

No âmbito desta norma a detecção de *L. monocytogenes* envolve quatro fases sucessivas e constam do diagrama da Fig 1, resumindo o modo operativo no qual se baseia o método:

- Enriquecimento primário;
- Enriquecimento secundário;
- Isolamento e identificação;
- Confirmação.

4. ENRIQUECIMENTO

A composição dos meios de enriquecimento selectivos referidos nos dois métodos descritos (meio *Listeria* Enrichment Broth, LEB, meio Half – Fraser e meio Fraser) é apresentada nos Anexos, assim como os respectivos suplementos adicionados.

Ambos os suplementos contêm **ácido nalidíxico** e **acriflavina**, dois elementos importantes, funcionando como agentes selectivos nos meios de enriquecimento.

A acriflavina inibe a síntese de RNA e a mitocondriogénese, o ácido nalidíxico inibe a síntese de DNA celular, sendo aplicado em várias formulações de meios de enriquecimento e de isolamento para inibir o crescimento de microrganismos Gram – negativos.

Em alguns meios podem ser associados com outros agentes selectivos, como por exemplo a **Cicloheximida**, que inibe o crescimento de fungos.

5. DETECÇÃO E ISOLAMENTO

5.1. Meio PALCAM

A composição deste meio assim como o respectivo suplemento é apresentada nos Anexos. Meio selectivo e diferencial utilizado na detecção e isolamento de *L. monocytogenes*. Este meio permite o crescimento desta bactéria e ao mesmo tempo inibe o crescimento de bactérias Gram - e outras Gram +. A elevada selectividade do meio resulta do seu conteúdo em **polimixina**, **acriflavina**, **ceftazimida** e **cloreto de lítio**.

Após incubação na estufa durante 48 h, as colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* apresentam-se sob a forma de colónias cinzento-esverdeadas de 1,5 mm a 2 mm de diâmetro, com uma depressão central rodeada de um halo negro (**Figura 1**). Estas características devem-se ao facto da bactéria hidrolisar a **esculina** presente no meio, dando glucose e esculetina. Esta última forma um complexo com iões de ferro que conferem a cor esverdeada e o halo negro que caracteriza as colónias desta bactéria em crescimento neste meio.



Figura 1 - Colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* em meio Palcam

5.2. Meio OXFORD

A composição deste meio assim como o respectivo suplemento é apresentada nos Anexos. Meio selectivo utilizado na detecção e isolamento de *L. monocytogenes*. Permite o crescimento desta bactéria, e similarmente ao meio PALCAM inibe o crescimento de bactérias Gram - e outras Gram +. A sua selectividade deve-se à presença de **cicloheximida, sulfato de colistina, acriflavina e fosfomicina**.

Após incubação na estufa durante 48 h, as colónias suspeitas de *L. monocytogenes* apresentam-se sob a forma de colónias cinzento-esverdeadas com cerca de 2 mm de diâmetro, com uma depressão central rodeada de um halo negro (**Figura 2**). Estas características devem-se também ao facto da bactéria hidrolisar a esculina presente no meio.

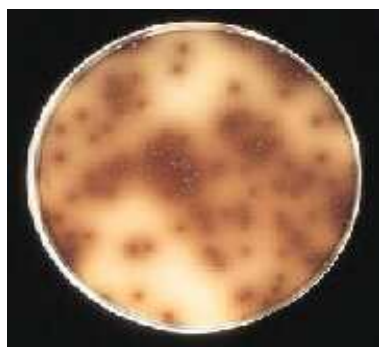


Figura 2 - Colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* em meio Oxford

5.3. Meio TSYEA

A composição e preparação deste meio é apresentada nos Anexos. Meio utilizado para caracterizar o desenvolvimento de colónias de *L. monocytogenes* previamente isoladas num dos meios selectivos descritos. Neste tipo de meio não é adicionado qualquer suplemento, não se tratando de um meio selectivo, mas sim um meio nutritivo usado para descrever a forma das colónias e conservar a bactéria, quando distribuído em tubos.

Após incubação na estufa durante 24 h, as colónias típicas apresentam cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, são convexas, cor cinzento-esverdeadas e translúcidas, com margens regulares, como já apresentado na **Figura 3**.



Figura 3 - Colónias de *Listeria monocytogenes* em TSYEA

6. CONFIRMAÇÃO

Apesar de não ser referido nos diagramas operatórios, antes da realização dos testes de confirmação (teste da catalase, coloração Gram e Api *Listeria*), são utilizados dois meios muito importantes nesta fase: o Agar de sangue e o ALOA, nos quais são repicadas as colónias que vão ser sujeitas aos testes posteriores.

6.1. Agar de sangue

A composição e preparação deste meio é apresentada nos Anexos. Meio utilizado para testar a reacção hemolítica da bactéria. Após incubação na estufa a 37°C durante 24 h as colónias de *L. monocytogenes* apresentam cor esbranquiçada, rodeadas de uma acentuada zona hemolítica, como apresentado na **Figura 4**. Neste meio como foi referido anteriormente, a *L. monocytogenes* é hemolítica e a *L. innocua* não é hemolítica.

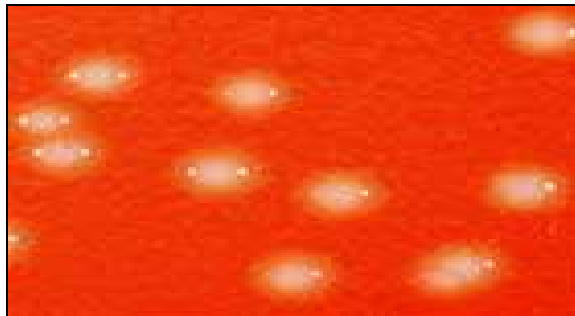


Figura 4 - Colónias de *Listeria monocytogenes* em Agar Sangue

6.2. Meio ALOA

A composição deste meio é apresentada nos Anexos. Meio selectivo e diferencial utilizado no isolamento de *Listeria* spp, nomeadamente na identificação de *L. monocytogenes*. Após incubação na estufa a 37°C durante 24 h, as colónias de *L. monocytogenes* apresentam uma cor esverdeada rodeadas de um halo opaco (**Figura 5**).

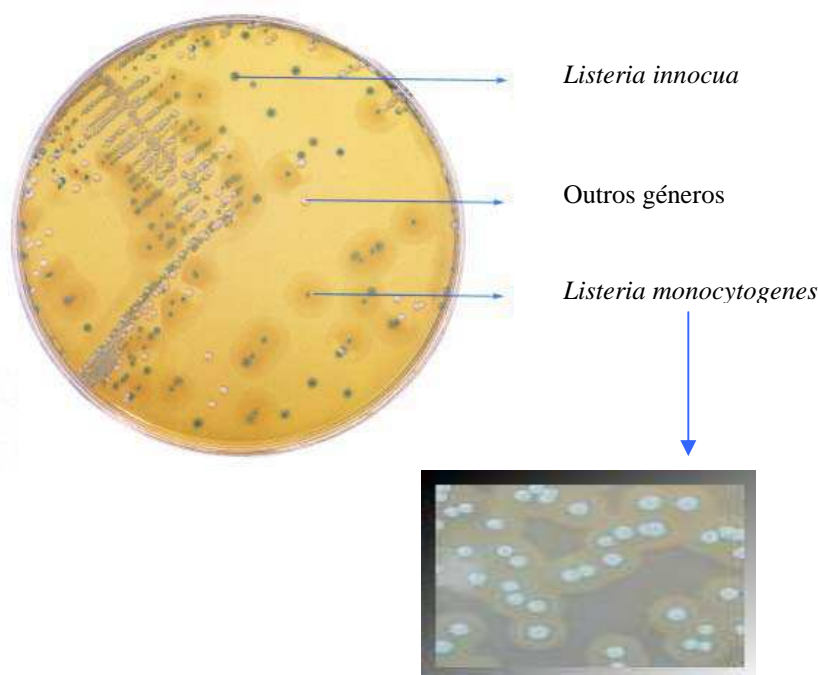


Figura 5 - Colónias características de *Listeria monocytogenes* em meio ALOA

A selectividade do meio é devida à presença de **cloreto de lítio**. A actividade diferencial é devida à presença no meio de um composto cromogénico, **X-glucosido**, que funciona como substrato para detecção da enzima α -glucosidase, que é comum a todas as espécies de *Listeria*.

A especificidade do meio, ou seja, a diferenciação entre *L. monocytogenes* e as outras espécies de *Listeria* é devida à produção da enzima fosfolipase pela *L. monocytogenes* que tem a capacidade de hidrolisar fosfolípidos purificados que são adicionados ao meio. Desta hidrólise resulta no halo opaco à volta das colónias. Apesar da grande selectividade e especificidade do meio, é necessário ter em atenção as colónias que crescem no meio, podendo por vezes ocorrer a presença de falsos positivos. (**Quadro 5**).

Quadro 5 - Descrição das colónias que se desenvolvem em meio ALOA

COLÓNIAS	DESCRIÇÃO
Colónias brancas	Não são <i>Listeria</i> spp. 100% de falsos negativos.
Colónias esverdeadas sem halo	<i>Listeria</i> sp, alguns falsos positivos. Falsos positivos = <i>Bacillus</i> spp (colónias grandes e rugosas) Muito raro encontrar <i>Staphylococcus</i> spp.
Colónias esverdeadas com halo	<i>Listeria monocytogenes</i> (positivos)= 99% Falsos positivos = Falsos positivos = 1% <i>L. ivanovii</i>, <i>Bacillus cereus</i>

Fonte: Adaptado de <http://www.microbiology-intl.com/ALOA/Tech.htm>

7.1. Teste da catalase

Teste utilizado para comprovar a presença da enzima **catalase** que se encontra na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo c.

Este teste consiste em:

- . Seleccionar uma colónia devidamente isolada em meio TSYA e colocá-la numa placa de Petri;
- . Com uma Pipeta de Pasteur adicionar uma gota de H₂O₂ (Peróxido de Hidrogénio) a 3%;
- . Observar a reacção e se ocorre: formação de bolhas (resultado positivo) ou não (resultado negativo).

As colónias de *L. monocytogenes* apresentam uma reacção catalase positiva.

7.2. Coloração Gram

A coloração Gram é uma coloração utilizada para diferenciação entre grupos taxonómicos. Na execução desta coloração deve seguir-se, escrupulosamente, a técnica e os tempos de actuação dos corantes e, ainda ter em atenção que a integridade da parede celular é absolutamente necessária para o reconhecimento das bactérias Gram+ e que células de algumas bactérias Gram+ quando jovens, podem tornar-se Gram- em culturas mais velhas reflectindo, provavelmente, modificações da parede celular.

Procedimento: A coloração de Gram requer o uso de:

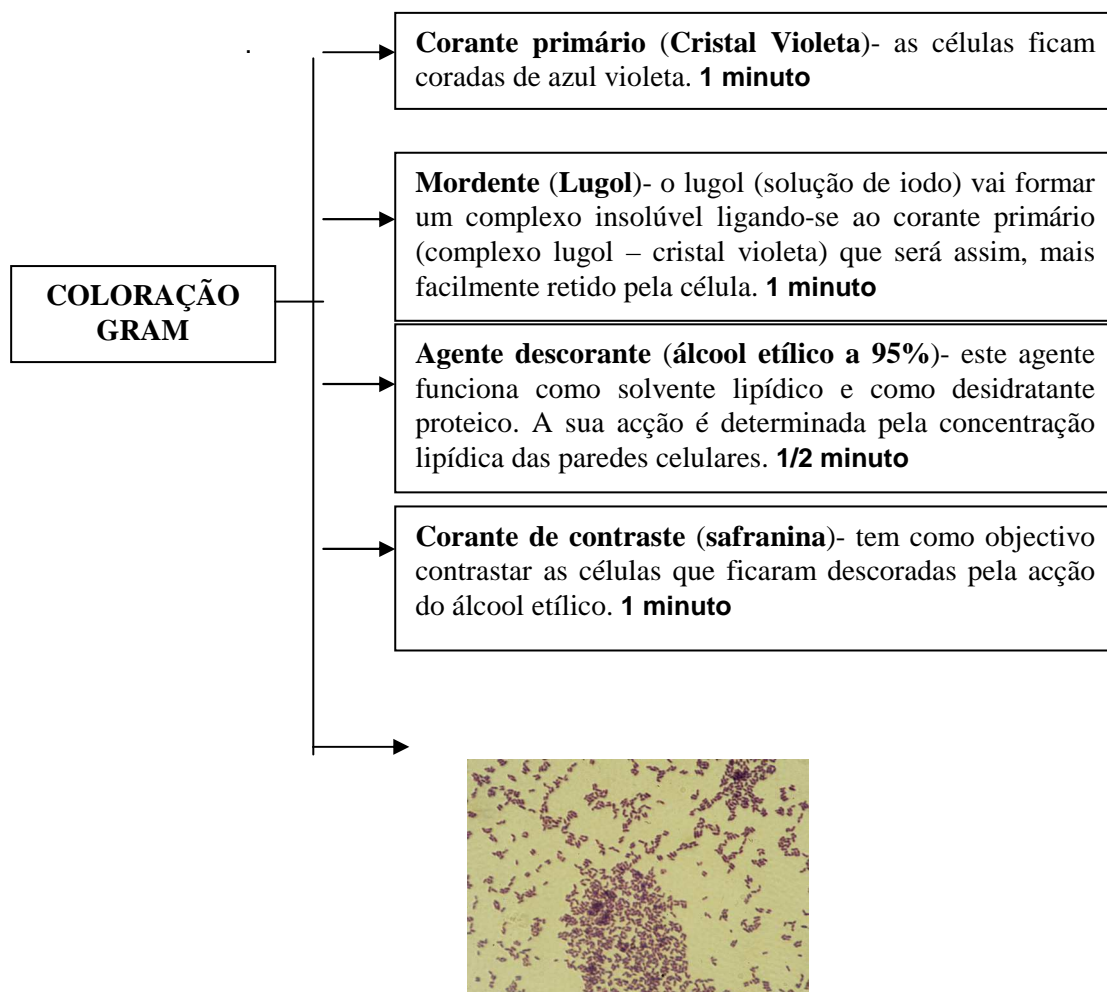


Figura 6 - Células típicas de *Listeria monocytogenes* coradas pela coloração de Gram quando observadas ao microscópio óptico com a objectiva de imersão .

7.3. API *Listeria*

O API *Listeria* é um sistema de identificação das espécies de *Listeria* que utiliza mini-testes padronizados em galerias e uma base de dados. A galeria API comporta 10 microtubos que contêm substratos desidratados que permitem a realização de testes enzimáticos ou fermentações de açúcares. As reacções produzidas durante o período de incubação traduzem-se pelas mudanças de cor de um indicador presente ou reveladas através da adição de reagentes (Fig.7). Após incubação durante 24 h a 37°C, a leitura das reacções é efectuada visualmente construindo um perfil numérico. Com o quadro de leitura fornecido pelo fabricante (Quadro 1). A obtenção do perfil numérico faz-se a partir da soma dos números relativos aos testes positivos: 1º quadrante 6 (4+2), no 2º quadrante 5 (4+1), no 3º quadrante 1 e no 4º quadrante 0, obtendo-se assim o perfil numérico 6510 (Fig.8). Consultando a lista de perfis fornecido pelo fabricante obtém-se a identificação. Cada caixa contém 10 galerias API, 10 ampolas de Suspension Medium, 1 ampola de reagente ZYM B, 10 câmaras húmidas de incubação, 10 fichas de resultados e 1 ficha técnica para interpretação de perfis numéricos e resultados.



Figura 7 - Perfil da espécie *Listeria monocytogenes*

Quadro 1 - Quadro de leitura das galerias API (BioMerieux)

Testes	Componentes activos	QTD (mg/cúp)	Reacções	Resultados	
				Negativo	Positivo
DIM	Substrato enzimático	0,106	Diferenciação <i>L.innocua</i> / <i>L.monocytogenes</i>	ZYM B ~ 3min	
				Laranja pálido Beige rosado Beige acizentado	Laranja
ESC	Esculina Citrato de ferro	0,16 0,024	Hidrólise(ESCulina)	Amarelo pálido	Negro
MAN	4-nitrofenil- α -D-manopiranosid o	0,045	α -MANosidase	Incolor	Amarelo
DARL	D-Arabitól	0,4	Acidificação(D-ARabitoL)	Vermelho/ vermelho alaranjado	Amarelo/ amarelo alaranjado
XYL	D-Xylose	0,4	Acidificação(XYLose)		
RHA	L-Rhamnose	0,4	Acidificação(RHAMnose)		
MDG	Metil- α -D-glucopiranosid o	0,4	Acidificação(Metil- α -D-glucopiranosido)		
RIB	D-Ribose	0,4	Acidificação(RIBose)		
G1P	Glucose-1-Fosfato	0,4	Acidificação(Glucose-1-Fosfato)		
TAG	D-Tagatose	0,4	Acidificação(TAGatose)		

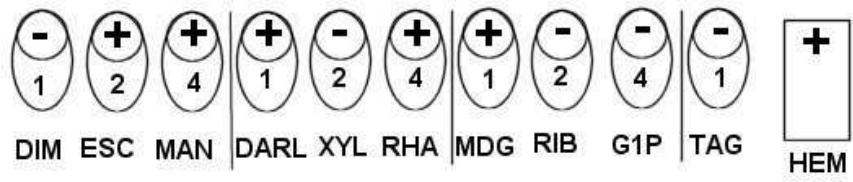
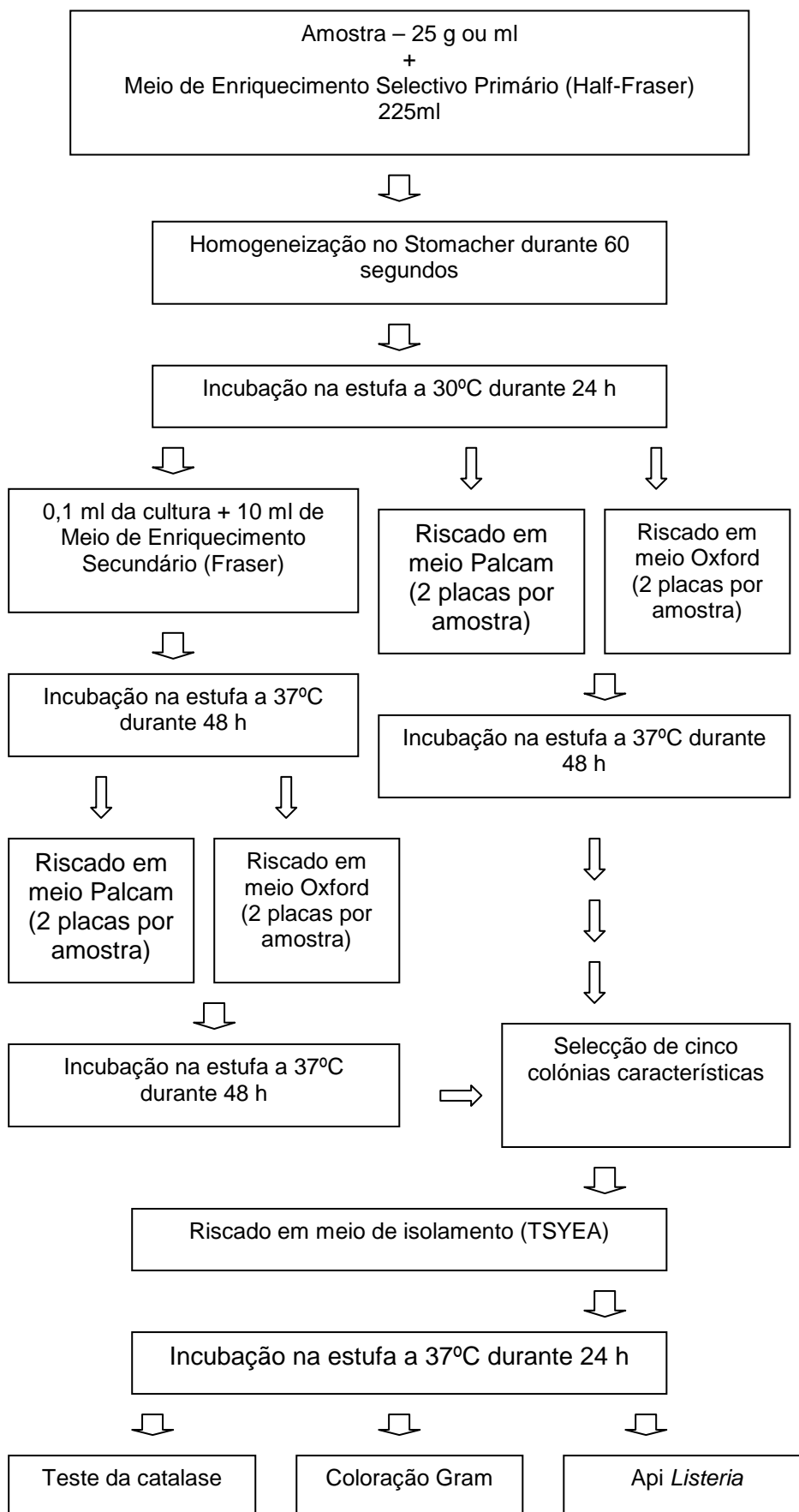


Figura 8 – Exemplo de uma ficha de leitura após registo dos resultados.

8. RESULTADOS

Figura. 9. Diagrama do modo operatório (ISO 11290 – 1, Fevereiro de 1997)



Detecção de *Salmonella* spp.

1. INTRODUÇÃO

Todas as *Salmonella* spp devem ser consideradas como potencialmente patogénicas para o homem. As aves e os animais contaminados constituem o principal reservatório de *Salmonella* e o homem é o principal reservatório de *Salmonella typhi*. É muito importante detectar a sua presença nos alimentos pois é exclusivamente por via oral que entra no corpo humano.

Como muitos alimentos são sujeitos a processamento e os processos tecnológicos podem danificar as células microbianas, não permitindo a sua rápida multiplicação, é importante que seja permitida uma prévia recuperação celular dos microrganismos, para ser possível a sua detecção nos alimentos. Estão presentes muitas vezes em maior número que as bactérias patogénicas, microrganismos competidores cujo crescimento é necessário inibir nos alimentos. É o caso do *Proteus* e da *Pseudomonas* cuja inibição é conseguida com o uso de meios contendo selenito, cisteína e verde brilhante. Em alguns alimentos, a temperatura de incubação pode reforçar a inibição de flora microbiana competidora, por isso deve ser sempre indicada no boletim de análise.

2. OBJECTIVO

Este procedimento descreve um método horizontal para a detecção de *Salmonella*, sendo aplicável aos produtos alimentares destinados ao consumo humano ou à alimentação animal.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Neste procedimento a detecção de *Salmonella* envolve quatro fases sucessivas e constam do diagrama da Fig 1, resumindo o modo operativo no qual se baseia o método:

- Pré-enriquecimento em meio não selectivo (pode variar de acordo com o alimento);
- Enriquecimento selectivo em meio líquido;
- Isolamento e identificação;
- Confirmação.

4. MATERIAL

1 - Água peptonada tamponada; caldo de Rappaport-Vassiliadis (RV); Caldo de Muller-Kauffmann tetracionato-novobiocina (MKTTn); agarde verde brilhante de Edel e Kampelmacher (AVBEK); agar de xilose lisina doxicolato (XLD); agar nutritivo (AN).

2 - Tubos de ensaio de 16x160 mm

3 - Placas de Petri.

4 - Pipetas de 1 ml.

5 - Sacos e peças para homogeneizador

6 - Homogeneizador.

7 - Ansa.

8 - Placas de Petri.

9 - Estufa a 37°C.

10 - Balança.

11 - Facas, pinças e tesouras esterilizadas

4. PROCEDIMENTO

1. Pesar 25 g da amostra para análise microbiológica (Esquema pag. 36).

2. Adicionar assepticamente 225 mL de água peptonada tamponada.

3. Homogeneizar a amostra seguindo o processo descrito no procedimento do protocolo do trabalho Preparação de amostras para análise microbiológica Preparar as diluições da amostra para análise microbiológica.

4. Incubar o saco a 37±1°C durante 24- 48 h.

5. Transferir com uma pipeta 0,1 ml da amostra para um tubo contendo RV. Transfira também 1 ml da amostra para MKTTn.

6. Incubar a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h.
 7. Os tubos incolores são resultados positivos. Com uma ansa esterilizada retirar uma amostra de cada um dos meios e riscar uma placa com AVBEK e outra com XLD .
 8. Incubar as placas a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h.
 9. Terminado o período de incubação verificar a presença de presumíveis colónias de *Salmonella*:
 - 9.1 estas colónias apresentam uma cor rosada ou vermelha, ficando o próprio agar com uma cor vermelha no AVBEK,
 - 9.2. Estas colónias apresentam em XLD uma cor rosa com ou sem o centro escuro(H_2S_{\pm}) ou amarelas com ou sem escurecimento (Lac_{\pm}).
- As colónias com estas características são purificadas e repicadas para tubos de AN Ao repicar as colónias deve ter em atenção a sua identificação e por isso deve numerá-las previamente. Toque com uma agulha esterilizada a colónia seleccionada e inocule i) uma placa em riscado ou/e ii) a cunha de agar em zig-zag. Proceda de igual modo para as restantes colónias suspeitas.
9. Incubar os tubos a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h.
 10. Após este período de incubação proceder à confirmação de *Salmonella* através dos testes serológicos e bioquímicos.

5. QUESTÕES PARA DISCUSSÃO

1. Em que meio detecta a fermentação da lactose e qual o resultado positivo para a presença de *Salmonella*?
2. Qual a razão para o teor de cloreto de magnésio no meio de RV?
3. Porque se forma um precipitado negro no tubo do meio de XLD?

6. RESULTADOS

SALMONELLA

Pesar 25g para 225ml de Água Peptonada Tamponada
Incubar a 37°C 48h

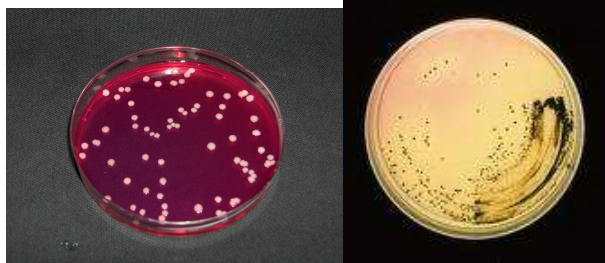
Pré-enriquecimento
37°C 48h

Inocular 0.1ml para Rappaport, incubar a 42° C 24-48h
e 1ml para Selenito-cistina, incubar a 37° C 24-48h

Repicar com ansa e por esgotamento, cada um dos meios para uma placa de AVBM e MKTTn
Incubar a 37°C 24-48h

Observação das colónias características:

- 1-AVBEK: Colónias vermelhas ou rosadas ficando o próprio meio também vermelho
- 2-MTTn: Colónias cor de palha com centro negro.



1

2

Repicar estas colónias características para Kligler
Incubar a 37°C 48h

Observação dos resultados positivos:

Zona superficial amarela, zona profunda amarela sem gás (*Shigella*)
Zona superficial vermelha, zona profunda amarela, com ou sem gás, com ou sem H₂S (*Salmonella*)



Repicar as reacções típicas 2 placas de agar nutritivo

API

Regras gerais para o cálculo e a expressão de resultados

1. Introdução

Quando se faz uma análise de um alimento para avaliar a sua qualidade microbiológica usando a contagem de colónias pelo método das placas, é inoculada apenas uma pequena toma da amostra em ensaio. Os resultados são expressos através do número de unidades formadoras de colónias (ufc) por unidade de massa ou volume da amostra. Cada ufc que originou uma colónia visível do microrganismo em estudo, representa uma ou mais células que estavam presentes na amostra diluída. Constatamos, portanto, que há causas de variação no processo analítico que são devidas por um lado à técnica em si mesma que apresenta erros de amostragem e de diluição e por outro lado são devidas ao analista, à população microbiana, ao meio de cultura e às condições de desenvolvimento. Um desvio acentuado relativamente à distribuição da variação estabelecida pela curva de Poisson num resultado de uma análise microbiana, é sinal de problemas no procedimento quantitativo (crescimento e contagem). A introdução de intervalos estatisticamente calculados nas observações que fazemos é por isso um instrumento que permite às técnicas analíticas o conhecimento do rigor obtido. Com vista a estimar a validade dos resultados, é necessário determinar com um grau de probabilidade, por exemplo de 95%, o intervalo de confiança (IC) em que eles se situam.

2. Cálculo e expressão dos resultados

2.1. Caso geral

Proceder à contagem das placas que contenham menos de 300 colónias (colónias totais, colónias características ou colónias presumíveis) e mais de 15 colónias. Qualquer dos métodos de cálculo abaixo indicados deve ter em conta as placas contendo 0 colónias.

Considerar as placas de 90 mm de diâmetro contendo no máximo 150 colónias características ou presumíveis por placa.

Calcular o número N de microrganismos por g ou por mL do produto analisado, efectuando a média ponderada a partir de duas diluições sucessivas com ajuda da fórmula:

$$(1) \quad N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)} \cdot d$$

$\sum c$ é a soma de todas as colónias nas placas retidas de duas diluições sucessivas,

V é o volume em ml do inóculo distribuído em cada placa,

n_1 é o número de placas na 1ª diluição retida,

n_2 é o número de placas na 2ª diluição retida e

d é a taxa de diluição corresponde à primeira diluição retida.

Nota 1: Em alguns casos pode ser difícil contar as colónias (por exemplo quando estão presentes microrganismos invasivos). Estes casos são tratados como casos especiais.

Nota 2: Não sendo possível contar de imediato as placas são conservadas à temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante um período máximo de 48 h.

Nota 3: Se forem usadas placas com um diâmetro diferente pondere o número máximo de colónias de acordo com a superfície da placa.

Exemplo:

Diluição 10^{-2} : 168 e 215 colónias.

Diluição 10^{-3} : 15 e 25 colónias

Volume 1 ml

$$N = (168 + 215 + 15 + 25) / (1(2 + (0,1 \cdot 2)) \cdot 10^{-2}) = 19182 = 1,9 \cdot 10^4 / \text{ml ou g}$$

Nota 4: O valor de um número de 3 ou mais algarismos é arredondado seguindo a regra do valor do último algarismo- se for inferior a 5, o algarismo precedente não se modifica; se for igual ou superior a 5, o algarismo precedente é aumentado uma unidade.

A contagem deve ser dada com um IC, sendo o intervalo mais usual o de 95 % que é calculado a partir de:

$$(2) \quad [\bar{x} \pm 2s]$$

s , desvio padrão é igual $\sqrt{s^2}$, s^2 é a variância

\bar{x} é média aritmética do total de colónias contadas nas placas da diluição escolhida

Nota 5: Em termos estatísticos este procedimento não é correcto porque não se podem fazer as médias aritméticas de populações com variâncias diferentes uma vez que a execução de cada diluição envolve um erro associado à sua execução de $\pm 10\%$. A diluição superior tem por isso maior erro devido ao erro de diluição que vai sendo adicionado.

Tabela 1. Limites de confiança aproximados de 95% para números de colónias contadas. Assumindo concordância com uma série de Poisson (Jarvis, 2000).

\bar{x}	Limites de confiança de 95%	Limites de confiança de 95% como % de \bar{x}
500	455-545	± 9
400	360-440	± 10
320	284-356	± 11
200	172-228	± 14
100	80-120	± 20
80	62-98	± 22
50	36-64	± 28
40	27-53	± 32
30	19-41	± 37
20	11-19	± 45
16	8-24	± 50
10	4-16	± 63
6	1-11	± 82

2.1.1 Casos especiais

Quando o número de colónias contadas é maior que 300 nas duas placas contendo a primeira diluição d_1 , com um número de colónias menor que 15 nas duas placas da diluição subsequente d_2 :

- se o número de colónias em cada uma das duas placas da diluição d_1 está compreendida no intervalo 324 a 300, limite superior do IC para uma média ponderada igual a 300, use o método referido em 2.1.

- se o número de colónias cada uma das duas placas da diluição d_1 for superior a 324, limite superior do IC para uma média pesada igual a 300, use apenas o resultado da contagem da diluição d_2 e proceda ao cálculo de uma contagem estimada N_E como em 2.3, excepto se o número de colónias de cada uma das duas placas da diluição d_2 for menor que o 10, limite inferior do IC para uma média ponderada igual a 15, visto que nesse caso a diferença entre as duas diluições é então inaceitável.

2.2.1. Modo de cálculo nos casos em que há identificação de microrganismos

Quando o método usado requer identificação, um dado número A (geralmente 5) de colónias presumivelmente suspeitas é isolado de cada placa retida para contagem. Depois de confirmada a identificação, calcular para cada placa o número a de colónias que estão de acordo com o critério de identificação, usando a equação seguinte:

$$(3) \quad a = (b/A).C$$

em que:

A é o número de colónias isoladas para identificação,

b é o número de colónias que estão de acordo com o critério de identificação e

C é o número total de colónias contadas na placa

Calcule o número N' de microrganismos identificados presentes na amostra como média ponderada substituindo na fórmula (1) o Σc por Σa

Exemplo:

Considere o resultado proveniente duma contagem de duas placas nas diluições retidas:

-a diluição (10^{-3}): 66 e 80 colónias

-a diluição (10^{-4}): 4 e 7 colónias

Foram repicadas para identificação:

1- para 66 colónias, 8 colónias das quais 6 correspondem ao critério de identificação,

2- para 80 colónias, 9 colónias das quais 6 correspondem ao critério de identificação,

3- para 7 colónias, 5 colónias das quais 4 correspondem ao critério de identificação e

4- para 4 colónias, as 4 das quais todas correspondem ao critério de identificação,

sendo assim usando a fórmula (2), $a = 50, 53, 6$ e 4 respectivamente.

(4)	$N' = \Sigma a / (n_1 + 0,1n_2) \cdot d$
-----	--

$N' = (50+53+6+4) / (2 + (0,1 \times 2) \times 10^{-3}) = 51\ 364$, arredondando $N' = 5,9 \times 10^4$ por ml ou g de produto analisado.

2.2.2. Casos especiais

2.2.2.1. Se o número de colónias características e não características nas duas placas da diluição d_1 for maior que 300, com colónias características ou identificáveis **visíveis** e se nas duas placas da diluição subsequente d_2 há menos de 300 colónias mas não se contam colónias características ou identificáveis, exprima o resultado assim:

- $< 1/d_2$ e mais de $1/d_1$ microrganismos por mililitro (alimentos líquidos) ou por grama (alimentos sólidos),

em que d_1 e d_2 são os factores das diluições correspondentes utilizadas.

Exemplo:

- a primeira diluição 10^{-2} retida para contar tem mais de 300 colónias em cada placa com colónias características ou identificáveis presentes,

- a segunda diluição retida para contar 10^{-3} tem 33 colónias e 35 sem colónias características ou identificáveis presentes.

O resultado exprime-se escrevendo que os microrganismos presentes na amostra são menos de 1000 ($1/d_2$) e mais de 100 ($1/d_1$) por mililitro (alimentos líquidos) ou por grama (alimentos sólidos).

2.2.2.2. Se o número de colónias características e não características nas duas placas da diluição d_1 for maior que 300, com colónias características ou identificáveis **não visíveis** e se nas duas placas da diluição subsequente d_2 há menos de 300 colónias mas não se contam colónias características ou identificáveis, exprima o resultado assim:

Exemplo:

- a primeira diluição 10^{-2} retida para contar tem mais de 300 colónias em cada placa sem colónias características ou identificáveis presentes,

- a segunda diluição retida para contar 10^{-3} tem 33 colónias e 35 sem colónias características ou identificáveis presentes.

O resultado exprime-se escrevendo que os microrganismos presentes na amostra são menos de 1000 ($1/d_2$) por mililitro (alimentos líquidos) ou por grama (alimentos sólidos).

2.3. Cálculo de números estimados

Se as placas correspondentes à amostra (produtos líquidos) ou à primeira diluição (produtos sólidos) contiver menos de 15 colónias, expressar o resultado da seguinte maneira

(5)	$N_E = C$	(produtos líquidos)
(6)	$N_E = C \times 1/d$	(produtos sólidos)

C é o número de colónias

d é a taxa de diluição correspondente à primeira diluição.

Exemplo:

Numa contagem de microrganismos a 30 °C, obtiveram-se os seguintes resultados

- na primeira diluição $d 10^{-1}$ contaram-se 12 colónias
- na diluição seguinte não se contaram colónias.

$$N_E = 12 \times 1/10^{-1} = 120$$

Arredondando o resultado, o número estimado de microrganismo é de $1,2 \times 10^{-2}$ por mililitro ou por grama.

Se as placas correspondentes à amostra (produtos líquidos) ou à primeira diluição (produtos sólidos) não contiver colónias, expressar o resultado da seguinte maneira:

- produtos líquidos < a 1 colónia por ml
- produtos sólidos < a $1 \times 1/d$ colónias por g, em que d é a taxa de diluição que corresponde à primeira diluição.

2.3.1. Precisão de resultados dos números estimados

Os resultados analíticos devem ser acompanhados por razões puramente estatísticas, dos intervalos de confiança (IC) que constam na Tabela 1, para um rigor probabilístico de 95%. Estes valores são calculados através da expressão (2).

2.4. Relatório de ensaio

Os resultados devem ser registados como o número de colónias para uma dada diluição e apresentados como se sugere no **quadro 1**. Por exemplo, referir as contagens 182, 200 e 260 anotando também a diluição que foi utilizada, 10^{-3} . O valor final deve ter só 2 algarismos significativos, o arredondamento é feito apenas no momento da conversão final mas o registo deve permitir saber como se obteve esse valor. Sem este cuidado as imprecisões são mascaradas (1 UFC na diluição 10^{-4} é equivalente a 300 UFC na 10^{-2}).

Em caso de maior rigor deve apresentar-se o intervalo de confiança (210000/g com um intervalo de confiança de 197000-231000).

Quando houver necessidade de fazer duplicados, é aconselhável que sejam usados dois tubos para cada diluição, sendo inoculada uma placa por tubo do duplicado das diluições. Em termos estatísticos, quando as contagens são acima de 100 é aceitável fazer médias de duplicados. O aumento para triplicados não reduz de forma significativa o erro estatístico.

Quadro 1. Exemplo de um Boletim de Análise de um Alimento

Data	Amostra	Tipo de contagem	Diluições (duplicado)	Incubação
27.12.2000	Fiambre	Totais (PCA)	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}	3 dias a 30°C
Diluyente: 0,1% peptona			UFC	
Homogeneização: Stomacher			>300, >300; 150, 162; 12, 17	
Média/g: $156 \cdot 10^3$				
Reportar como $1.6 \cdot 10^5$ /g		Limite de confiança 95%: $312 \pm 1.96 \sqrt{(312)} / 2 = 139$ e 173		

ANEXO- MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Agar nutritivo (g/L)

Ext. carne	3g
BactoTryptona	5g
Agar	15g
Água dest	1000 ml

pH $7 \pm 0,2$ a 25°C

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Água peptonada (g/L)

Tryptona	15
Água dest.	1

pH - 7

Distribuir o meio de cultura em volumes de 10cm³ por tubos de 16mm x 160mm.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Água peptonada tamponada (g/L)

Peptona	10g
NaCl	5g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9g

(Hidrogenofosfato de sódio)

H ₂ O dest	1
-----------------------	---

pH - 7

Distribuir em balões com 100 ml.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Agar de Ferro de Kligler (AFK)

Componentes	g/l
Tryptona	20
Extracto de levedura	3,0
Extracto de carne	3,0
Glucose	1
Lactose	10
Cloreto de sódio	5,0
Tiosulfato de sódio	0,5
Citrato de ferro(III)amoniaco	0,5
Vermelho de fenol	0,025
Agar	9-18 ^(a)
Água destilada	1

(a) De acordo com o poder gelificante do agar

Modo de preparação:

Dissolver os componentes em água destilada aquecendo até à ebulição, se necessário, agitando para dissolução completa. Ajustar o pH, se necessário, de modo a que depois seja de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C.

Distribuir em tubos. Esterilizar em autoclave a 121°C/15min..

Agar de Salmonella-Shigella

Componentes	g/l
Digerido pancreático de carne	5
Extracto de carne	5
Lactose	10
Sais de bilis	8,5
Citrato de sódio	10
Tiosulfato de sódio	8,5
Citrato de ferro(III)amoniaco	1
Vermelho neutro	0,025
Verde brilhante	0,0033
Agar	9-18 ^(a)
Água destilada	1

(a) De acordo com o poder gelificante do agar

Modo de preparação:

Dissolver os componentes em água destilada aquecendo até à ebulição, se necessário, agitando para dissolução completa. Não esterilizar.

Ajustar o pH, se necessário, de modo a que depois seja de $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .

O meio tem a validade de um mês, se conservado em frigorífico a 4°C .

Agar de Sulfito de Ferro (ASF)

Componentes	g/l
Triptose	15
Peptona de soja	5
Extracto de levedura	5
Bissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	1
Citrato de ferro(III)amoniacal	1
Agar	9-18 ^(a)
Água destilada	1

(a) De acordo com o poder gelificante do agar

Modo de preparação:

Dissolver os componentes em água destilada aquecendo até à ebulição, se necessário, agitando para dissolução completa.

Ajustar o pH, se necessário, de modo a que depois da esterilização ele seja de $7,6 \pm 0,1$ a 25°C .

Distribuir o meio em volumes de 15 e 10 ml respectivamente por tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm e 20 mm x 200 mm.

Esterilizar em autoclave a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

O meio tem a validade de duas semanas, se conservado em frigorífico a 4°C .

Agar de Verde Brilhante de Edel e Kampelmacher (AVBEK)

Componentes	g/l
Triptona	10
Extracto de levedura	3
Extracto de carne	5
Sacarose	10
Lactose	10
Cloreto de sódio	5
Fosfato dissódico	1
Fosfato monossódico	0,6
Vermelho de fenol	0,090
Verde brilhante	0,005
Agar	14
Água destilada	1

Modo de preparação:

Dissolver os componentes em água destilada aquecendo até à ebulição, se necessário, agitando para dissolução completa. Ajustar o pH, se necessário, de modo a que depois seja de $6,9 \pm 0,2$ a 25°C .

Distribuir em tubos. Não autoclavar.

O meio tem a validade de um mês, se conservado em frigorífico a 4°C .

B.H.I. (Brian Heart Infusion) (g/l)

Infusão de cérebro de vitela	200
Infusão de coração	250
Proteose peptona	10
Dextrose	2
Cloreto de sódio	5
Monodrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4)	2,5
Água destilada	1 000 ml

pH $7,2 \pm 0,1$ a 25°C

Os componentes ou o meio de cultura desidratado dissolve-se em água destilada até à ebulição se necessário. Distribui-se em volumes de 10cm^3 por tubos 16mm x 160mm.

Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Caldo de BÍlis e Verde Brilhante (g/L)

	Concentração simples	Concentração dupla
Triptona	10	20
Lactose	10	20
BÍlis de boi desidratada	20	40
Verde Brilhante	0,0133	0,0266
Água dest.	1000 ml	1000 ml

Preparação dos meios de cultura:

Dissolvem-se os componentes ou o meio de cultura desidratado na água destilada, aquecendo até à ebulição, se necessário.

Ajusta-se o pH de modo a que depois da esterilização este seja de $7,2 \pm 0,1$ a 25°C .

Distribui-se o meio de cultura em volumes de 10cm^3 por tubos de 16 mm x 160 mm para os meios (a) e de 20 mm x 220 mm para os meios (b), com tubos de Durham.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Os tubos de Durham não devem conter bolhas de ar após a esterilização

Caldo Lactosado (g/L)

	Concentração simples (a)	Concentração dupla (b)
Extracto de carne	3	6
Peptona	5	10
Lactose	5	10
Água destilada	1000 ml	1000 ml

Preparação dos meios de cultura:

Dissolvem-se os componentes ou o meio de cultura desidratado na água destilada, aquecendo até à ebulição, se necessário.

Ajusta-se o pH de modo a que depois da esterilização este seja de $7,2 \pm 0,1$ a 25°C .

Distribui-se o meio de cultura em volumes de 10cm^3 por tubos de 16 mm x 160 mm para os meios (a) e de 20 mm x 200 mm para os meios (b).

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Caldo de Rappaport-Vassiliadis (CRV)

Componentes	g/l
Triptona	4,50
Cloreto de sódio	7,20
Hidrogeno fosfato de potássio	1,44
Cloreto de magnésio anidro	13,3
Verde malaquite (oxalato)	0,036
Água destilada	1

Modo de preparação:

Dissolver os componentes em água destilada aquecendo até à ebulição, agitando para dissolução completa. Ajustar o pH, se necessário, de modo a que ele seja de $7,0 \pm 0,2$ a 25°C . Não autoclavar.

Distribuir o meio em volumes de 10 ml por tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm.

Esterilizar em autoclave a $115 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min .

Caldo de Selenito Cistina (CSC)

Componentes	g/l
Triptona	5
Lactose	4
Fosfato dissódico	10
Selenito de sódio	4
L-cistina	10
Água destilada	1

Modo de preparação:

Dissolver os componentes em água destilada agitando para dissolução completa.

Ajustar o pH, se necessário, de modo a que depois da esterilização ele seja de $5,2 \pm 0,1$ a 25°C .

Distribuir o meio em volumes de 10 ml por tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm.

Esterilizar em autoclave a $115 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min .

Endo agar (g/L)

Peptona	10g
Lactose	10g
K_2HPO_4	3,5g
Agar	15g
Fucsina básica	0,5g
Na_2SO_4	2,5g
Água dest.	1000 ml

pH $7,5 \pm 0,2$ a 25°C

Esterilizar a 121°C durante 15 min

E.V.A. (Etil Violeta Agar) (g/l)

Triptose	20
Dextrose	5
Fosfato Bipotássico	2,7
Fosfato Monopotássico	2,7
NaCl	55
Azida de sódio	0,4
Violeta de etilo	0,00083
Água destilada	1000 ml

Preparação:

Os componentes dissolvem-se em água destilada aquecendo até à ebulição, se necessário.

Ajusta-se o pH, de modo a que depois da esterilização seja de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C .

Distribuem-se o meio em volumes de 10cm^3 por tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm.

Esteriliza-se em autoclave a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Meio de "Baird-Parker" (g/l)

Triptona	10g
Extracto de carne	5g
Extracto de levedura	1g
Cloreto de lítio	5g
Piruvato de sódio	10g
Glicina-ácidoaminoacético	12g
Agar	20g
água destilada	1 000 ml

pH $7,2 \pm 0,2$ a 25°C

Distribuir em frascos com 100 ml meio.

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

No momento da utilização junta-se, assepticamente, a 100 ml de meio previamente fundido e arrefecido a 50°C , as seguintes soluções:

Suplementos

Glicina a 20%	5 ml
Piruvato de sódio a 20%	5 ml
Solução de sulfametazine	2,5 ml
Emulsão de gema de ovo e telurito de potássio	5 ml

Meio de cultura "B.H.I." (Brian Heart Infusion)

Infusão de cérebro de vitela	200
Infusão de coração	250
Proteose peptona	10
Dextrose	2
Cloreto de sódio	5
Monodrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4)	2,5
Água destilada	1 000 ml

Os componentes ou o meio de cultura desidratado dissolve-se em água destilada até à ebulição se necessário. Distribui-se em volumes de 10cm³ por tubos 16mm x 160mm. Ajusta-se o pH de modo a que depois da esterilização seja 7,4 ± 0,1 a 25°C.

Meio de "Chapman"	Concentração	dupla (a)	simples (b)
Triptona (peptona tríptica de caseína)		10g	5g
Extracto de carne		12g	6g
Proteose peptona		10g	5g
Cloreto de sódio (NaCl)		150g	75g
Lactose		15g	7,5
Agar		1g	0,5g
água destilada		1 000 ml	1 000 ml

Preparação:

Os componentes dissolvem-se em água aquecendo à ebulição, se necessário.

Ajusta-se o pH de modo a que depois da esterilização seja 7,4 ± 0,1 a 25°C.

Distribui-se em volumes de 10cm³ por tubos de 22mm x 220mm para o meio (a) e em volumes de 10cm³ por tubos de 16mm x 160mm para o meio (b).

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Meio de "Rothe" (g/l)	concentração	simples (a)	dupla (b)
Triptose		20	40
Dextrose		5	10
NaCl		5	10
Fosfato Bipotássico		2,7	5,4
Fosfato Monopotássico		2,7	5,4
Azida de sódio		0,2	0,4
Água destilada		1000 ml	1000 ml

Preparação:

Os componentes dissolvem-se em água destilada aquecendo até à ebulição, se necessário.

Ajusta-se o pH, de modo a que depois da esterilização seja de 7,2 ± 0,2 a 25°C.

Distribuem-se os meios (a) e (b) em volumes de 10cm³ respectivamente por tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm e 22 mm x 220 mm.

Esteriliza-se em autoclave a 121± 1°C durante 15 mi n.

M.R.S. gelosado (g/l)

Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levedura	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20
Monoidrogenofosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	4
Acetato de sódio (CH ₃ COONa.3H ₂ O)	5
Citrato diamónico [(C ₆ H ₆ C ₇ (NH ₄) ₂]	2
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,2
Sulfato de manganésio (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0,05
Tween 80 (Oletato de manosorbitol)	1 ml
Agar	15
Água destilada	1 000 ml

pH=6,6

Distribuir em frascos de 100 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

No momento de utilização adiciona-se a cada frasco depois do meio fundido 1 ml de solução de cloreto de trifeniltetrazólio a 1% e 2 ml de solução de acetato de tálio a 5%.

Reagente de Kovac

Paradimetilamino-4- benzaldeído	5g
álcool amílico	75 mL
ácido clorídrico puro (p20=1,18 a 1,19g.mL ⁻¹)	25 mL

Dissolver o aldeído no álcool em banho-maria a 60°C . Arrefecer e juntar o ácido gota a gota, agitando sempre.

Solução de acetato de tálio a 5%

Acetato de tálio	5g
Água destilada	100 ml

Esterilização por filtração em bomba de vácuo.

Solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1%

Cloreto de trifeniltetrazólio	1g
Água destilada	100 ml

Esterilização por filtração em bomba de vácuo.

Solução de ferro amoniacal

Sulfato de ferro III amoniacal	5 g
Fe NH ₄ (SO ₄) ₂ · 12H ₂ O (alúmen ferro)	
Água destilada	100 ml

Esterilizar por filtração.

Não utilizar para além de 10 dias.

Solução de Ringer a 1/4 (g/L)

Cloreto de sódio	2,25
Cloreto de potássio	0,105
Cloreto de cálcio, hidratado	0,12
Hidrogeno carbonato de sódio	0,05
Água dest.	1000 ml

Dissolver os sais na água, e esterilizar a 121°C por 15 min.

Solução salina peptonada (g/L)

Peptona	1
Cloreto de sódio	8.5
Água dest.	1000 ml

Dissolver e distribuir 100 mL em frascos de tampa roscada, ajustar pH 7,0±0,1. A esterilização é feita em autoclave 121°C durante 15 minutos.

Solução de sulfito de sódio

Sulfito de sódio (Na ₂ SO ₃ · 7H ₂ O)	1
Água destilada	9 ml

Dissolver o sulfito de sódio em água destilada. Esterilizar através de um sistema de membrana filtrante.

Solução de triptona sal (g/L)

Cloreto de sódio	8,5
Triptona	3
Água dest.	1000 ml

pH 7

Dissolver e distribuir 100 mL em frascos de tampa roscada. A esterilização é feita em autoclave 121°C durante 15 minutos.

Tampão fosfato (0,15 M, pH 8)

Soluto A (g/L)	
Fosfato monopotássico (PO ₄ H ₂ K)	9,075
Água dest.	1000 ml

Dissolver e distribuir 100 mL em frascos de tampa roscada. A esterilização é feita em autoclave 121°C durante 15 minutos.

Soluto B (g/L)

Fosfato dissódico (PO ₄ Hna ₂ .2H ₂ O)	11,870
Água dest.	1000 ml

Dissolver e distribuir 100 mL em frascos de tampa roscada. A esterilização é feita em autoclave 121°C durante 15 minutos.

Juntar, assepticamente num frasco esterilizado 5,5 mL de soluto A e 94,4 mL de soluto B.

Triptona-glucose-extracto-agar (g/L)

Extracto de carne	3g
Triptona	5g
D-glucose	1g
Agar	15g
H ₂ O dest	1000 ml

pH - 7

Distribuir 100 ml em frascos com tampa roscada de alumínio. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

V.L. Agar (Viande - Levure) (g/l)

	Concentração simples (a)	Concentração dupla (b)
Triptona	10g	20g
NaCl	5g	10g
Extracto de carne	4g	8g
Extracto de levedura	5g	10g
Cloridrato de cisteína	0,3g	0,6g
Glucose	2g	4g
Amido solúvel	1g	2g
Agar	8g	16g
Água destilada	1 000 ml	1 000 ml

Preparação:

Os componentes dissolvem-se em água destilada aquecendo até à ebulição, se necessário.

Ajusta-se o pH, de modo a que depois da esterilização seja de $7,1 \pm 0,1$ a 25°C.

Distribuem-se os meios (a) e (b) em volumes de 10 cm³ respectivamente por tubos de ensaio de 16 mm x 160 mm e 20 mm x 200 mm.

Esteriliza-se em autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 min.

A este meio de cultura quando utilizado na pesquisa de clostrídeos sulfito-redutores adiciona-se, após a regeneração 0,5 ml de uma solução de sulfito de sódio e 4 gotas de alúmen de ferro.

Meio de enriquecimento selectivo LEB (Listeria Enrichment Broth)

Composição (g/l)	pH 7,3~2	10-25 °C
Caldo triptona de soja	30,0	
Extracto de levedura	6,0	

Modo de preparação:

Pesar 18,0 g de meio LEB em pó;

Colocar dentro de um frasco Schott de 500 ml;

Medir 500 ml de água destilada e adicionar ao frasco;

Agitar e autoclavar a 121 °C.

Suplemento LISTERIA Suplemento de Enriquecimento selectivo

(adicionado a cada frasco de 500ml de LEB no dia da preparação das amostras)

Conteúdo :

Ácido nalidíxico	20,0mg
------------------	--------

Cicloheximida 25,0mg

Clorhidrato de acriflavina 7,5mg

Instruções:

Adicionar assepticamente, 2 ml de água destilada estéril a um frasco. Homogeneizar muito suavemente. Adicionar o conteúdo do frasco a 500 ml de meio LEB.

Precauções:

Este suplemento deve utilizar-se exclusivamente para diagnóstico "in vitro". Não utilizar se passou de validade.

Conservação:

LISTERIA Suplemento de Enriquecimento Selectivo deve conservar-se entre 2°C-8°C, no escuro.

Meio PALCAM

▫ Composição da base (g/l): pH 7,2~0,2 10-25°C

Peptona 23,0

Extracto de levedura 3,0

Amido 1,0

Cloreto de sódio 5,0

Agar-agar 13,0

D(-)-manitol 10,0

Citrato de amónio e ferro 0,5

Esculina 0,8

Glucose 0,5

Cloreto de lítio 15,0

Fenol vermelho 0,08

▫ Modo de preparação:

Pesar 35,9 g de meio Palcam em pó;

Colocar no interior de um frasco Schott de 500 ml;

Medir 500 ml de água destilada e adicionar ao frasco;

Agitar e autoclavar a 121°C;

Colocar no banho-maria até atingir uma temperatura de ~50°C;

Adicionar o suplemento;

Proceder ao plaqueamento.

▫ **Suplemento PALCAM Suplemento Selectivo**

(adicionar a cada frasco de 500 ml antes do plaqueamento):

Conteúdo :

Polimixina B 5,0 mg

Clorhidrato de acriflavina 2,5 mg

Ceftazidima 10,0 mg

Instruções

Adicionar assepticamente, 2 ml de água destilada estéril a um frasco. Homogeneizar muito suavemente. Adicionar assepticamente, o conteúdo do frasco a 500 ml de Palcam Agar Base que deve estar a uma temperatura de 50 °C.

Precauções

PALCAM Suplemento Selectivo deve utilizar-se exclusivamente para diagnóstico "in vitro". Não utilizar se passou de validade.

Atenção: este produto contém ceftazidima. A acriflavina é activada pela luz e esta activação pode ser inibitória para o crescimento de Listeria. Não respirar o pó.

Conservação

PALCAM Suplemento Selectivo deve conservar-se entre 2 °C-8 °C no escuro, **permanecendo** estável nestas condições.

Meio OXFORD

Composição da base (g/l) pH 7,0~0,2 10-25 °C

Agar Base de Sangue Columbia 39,0

Esculina 1,0

Citrato de ferro amoniacal 0,5

Cloreto de lítio 15,0

Modo de preparação:

Pesar 27,75 g de meio Oxford em pó;
Colocar no interior de um frasco Schott de 500 ml;
Medir 500 ml de água destilada e adicionar ao frasco;
Agitar e autoclavar a 121 °C;
Colocar no banho-maria até atingir uma temperatura de ~50 °C;
Adicionar o suplemento;
Proceder ao plaqueamento.

Suplemento LISTERIA Suplemento Selectivo (Formulação Oxford)

(adicionar a cada frasco de 500 ml antes do plaqueamento):

Conteúdo por frasco

Cicloheximida	200,0 mg
Sulfato de Colistina	10,0 mg
Acriflavina	2,5 mg
Cefotetano	1,0 mg
Fosfomicina	5,0 mg

Instruções

Adicionar assepticamente, 5 ml de Etanol a 70% a um frasco. Homogeneizar muito suavemente.
Adicionar assepticamente, o conteúdo do frasco a 500 ml de Listeria Agar Base Selectivo (Oxford) esterilizado e que deve estar a uma temperatura de 50 °C.

Precauções

Listeria Suplemento Selectivo (formulação Oxford) deve utilizar-se exclusivamente para diagnóstico "in vitro". Não utilizar se passou da validade.

Atenção

Este produto contém cicloheximida, acriflavina, sulfato de colistina e fosfomicina. A acriflavina é activada pela luz e esta activação pode ser inibitória para o crescimento de Listeria.

Conservação

Listeria Suplemento Selectivo (formulação Oxford) deve conservar-se entre 2 °C-8 °C e no escuro, permanecendo estável nestas condições.

Meio TSYEA

Componentes

TSB (Tryptone Soya Broth)

Composição (g/l):pH 7,3-0,2	10-25 °C
Digerido pancreático de caseína	17,0
Digerido papeínico de semente de soja	3,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dipotássico	2,5
Glucose	2,5

Extracto de levedura

Composição (% p/p) pH (1% solução) 7,0	10-25 °C
Azoto total	9,8
Azoto amínico	5,1
Cloreto de sódio	0,3

Agar-Agar

Modo de preparação:

Pesar 15 g de TSB;
Colocar o TSB no interior de um frasco Shott;
Pesar 3 g de extracto de levedura e colocar também dentro do frasco;
Medir 500 ml de água destilada com uma proveta e colocar no interior do frasco;
Agitar o frasco para homogeneizar, e se necessário com a ajuda do aparelho de ultra-sons;
Pesar 7-9 g de Agar-Agar e colocá-lo no interior do frasco;

Agitar novamente o frasco;
Esterilizar no autoclave a 121 °C;
Colocar o frasco no banho-maria a uma temperatura de 55 °C;
Proceder ao plaqueamento, deixar secar as placas e depois guardá-las no frigorífico.

Nota: Este meio não necessita de adição de suplemento, uma vez que funciona como meio de alimento para a bactéria e não como meio de detecção.

Meio Agar de Sangue (meio sólido utilizado para testar o tipo de hemólise da bactéria)

Agar de base

▫ Composição:

Base de Agar de sangue	500 ml
Sangue de cavalo inteiro	25 ml

Modo de preparação:

1ª camada

Pesar 12,5 g de Agar Nutritivo ,
Pesar 10,0 g de Agar-Agar ;
Colocar num frasco Schott de 500 ml e medir 500 ml de água destilada;
Agitar para homogeneizar;
Esterilizar no autoclave a 121 °C
Colocar no banho-maria para arrefecer;
Proceder ao plaqueamento colocando em cada placa cerca de 12 ml de Agar Nutritivo definitivo.

2ª camada

Pesar 20,0 g de Base de Agar de sangue;
Colocar num frasco Schott de 500 ml;
Medir 500 ml de água destilada e colocar dentro do frasco;
Agitar para homogeneizar;
Esterilizar no autoclave a 121 °C;
Colocar no banho-maria para arrefecer um pouco;
Adicionar o sangue de cavalo ao meio líquido e agitar;
Proceder ao plaqueamento das placas que contêm o meio Agar Nutritivo com cerca de 18 ml do meio;
Deixar secar as placas e guardá-las no frigorífico.

Caldo base Fraser (Fraser Broth Base) (meio comum Half-fraser e Fraser)

▫ Composição (g/l): pH 7,2 ~0,2

Proteose peptona	5,0
Triptona	5,0
Extracto de carne	5,0
Extracto de levedura	5,0
Cloreto de sódio	20,0
Hidrogenofosfato de sódio	12,0
Dihidrogenofosfato de potássio	1,35
Esculina	1,0
Cloreto de lítio	3,0

▫ Modo de preparação:

Pesar 28,7 g de meio Fraser (Fraser Broth Base);
Colocar no interior de um frasco Schott de 500 ml;
Medir 500 ml de água destilada e juntar ao frasco;
Agitar para homogeneizar e autoclavar a 121 °C;

Deixar arrefecer.

Suplementos (meio Half-fraser e Fraser)

Concentração:

	Half-fraser:	Fraser:
Citrato de ferro amoniacal	112,50 mg	250,0 mg
Ácido nalidíxico	2,25 mg	10,0 mg
Acriflavina	2,8125 mg	12,5 mg

Instruções

Adicionar assepticamente 4 ml de etanol e água destilada na proporção 50:50. Homogeneizar muito suavemente. Adicionar assepticamente o conteúdo do frasco a a 500 ml de caldo base, (Fraser) ou a 225 ml de caldo base Half-Fraser .

Precauções

Fraser Suplemento Selectivo a média concentração deve utilizar-se exclusivamente para diagnóstico "in vitro". Não utilizar se passou da validade.

Atenção

Este produto contém ácido nalidíxico.

Conservação

Conservar entre 2 °C-8 °C, no escuro. Nestas condições permanecerá estável até à data limite da validade.

Meio ALOA

Componente	Quantidade
Peptona	26 g/L
Extracto de levedura	8 g/L
Factores de crescimento	4,2 g/L
Cloreto de sódio	5 g/L
Fosfato dissódico	2,5 g/L
Cloreto de lítio	10 g/L
X - glucose	0,05 g/L
Substrato L.M.	20 mL
Agar	15 g/L
Ácido nalidíxico	0,02 g/L
Ceftazidina	0,02 g/L
Cicloheximida	0,10 g/L
Polimixina B	100000 UI

Preparação: seguir as instruções do fabricante.

API LISTERIA

Composição do meio e do reagente (API *Listeria*, BioMerieux)

Suspension Medium 2 ml	Água desmineralizada	
	Fast Blue BB	0,35 g
Reagente ZYM B 8 ml	2-metoxi etanol	100 ml

BIBLIOGRAFIA

- APHA (1984) - Compendium of methods for the microbiological examination of foods, chap. 3, 2nd Ed., Marvin L. Speck: Baltimore.
- CORRY, J., CURTIS, G., BAIRD, R. (1995). Culture media for Food Microbiology. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- BOARD, R.G.; DOROTHY JONES AND SKINNER, F.A.(1992) Identification methods in applied and environmental microbiology, The Society for Applied Bacteriology Technical Series nº 29, Blackwell Sc Publ.
- FELGUEIRAS, M.I. (1983) - Características microbiológicas nacionais e internacionais de alimentos. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. DCEAI N.º 141, R-23.
- HARRIGAN, W. F. (1998). Laboratory methods in Food Microbiology (3rd ed.). Academic Press, San Diego, USA.
- ICMSF (1983). Microbiologia de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. Editorial ACRIBIA. Zaragoza (Espanha)
- ICMSF (1983) - Ecologia Microbiana de los alimentos 1. Editorial Acribia Zaragoza.
- JAY, J.M. (1986) - Microbial Spoilage Indicators and Metabolites. In "Foodborne Microorganisms and Their Toxins: Developing Methodology", pp 221, ed. by Pierson and Stern, Marcel Dekker, Inc.: New York.
- MOSSEL D.A.A., MORENO GARCIA, B. (1985) - Microbiologia de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (Espanha).
- Jarvis, B. (2000). Sampling for microbiological analysis, in : The microbiological safety and quality of food, Ed. B.Lund, T.C. Baird-Parker and G.W.Gould, Aspen Publication: Maryland.
- Lightfoot, N.F. & Maier, E.A. (2003). Análise microbiológica de alimentos e água, Fundação Caluoste Gulbenkian: Lisboa.

Normas Portuguesas e ISO

- NP - 896 - GORDURAS E OLEOS COMESTÍVEIS Preparação das amostras para laboratório.
- NP - 895 - GORDURAS E OLEOS COMESTÍVEIS - Colheita de amostras
- NP - 908 (1985) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Leite condensado. Contagem de microrganismos a 30°C. Processo de referência.
- NP - 916 - Colheita de amostras. Terminologia. Análise microbiológica.
- NP-1410 (1984) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Sumos e polmes de frutos e produtos hortícolas e seus derivados. Pesquisa de bactérias coliformes.
- NP - 1491 - MANTEIGA - Colheita de amostra para análise.
- NP-1826 (1982) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Manteiga. Pesquisa de bactérias coliformes.
- NP -1828 (1982)- MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Colheita da amostra para análise microbiológica.
- NP-1829 (1982) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Preparação da amostra para análise microbiológica.
- NP-1975 (1985) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Pescado e derivados. Pesquisa de bactérias coliformes
- N -2079 (1983) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR - Regras gerais para análise microbiológica.
- NP-2164 (1983) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais para a pesquisa de bactérias coliformes.
- NP - 2260 (1985) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*.
- NP - 2262 (1985) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais para a pesquisa de Clostrídeos sulfito-redutores.
- NP-2308 (1985) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais para a pesquisa de *Escherichia coli*.
- NP 2307 (1987) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais para contagem de microrganismos psicotróficos.
- NP-3005 (1985) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Preparação das diluições para análise microbiológica.
- NP-3278 (1986) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Pescado e derivados. Contagem de microrganismos a 30°C.
- NP – 4196 (1992) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais para a contagem de *Staphylococcus aureus* 37°C.
- NP 4405 (2001)- MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais par a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C.
- NP - 4417 (2002) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR. Regras gerais para a contagem de bactérias sulfito-redutoras crescidas em condições de anaerobiose (Método corrente).
- ISO 4833 (1991) MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS- General rules for microbiological examinations. Colony count techniqe at 30° C.
- ISO 7218 (1996) -MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS. General rules for microbiological examinations.
- ISO 6579 (2002) - MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 11290-1 (1996) - MICROBIOLOGIA ALIMENTAR-Método horizontal para detecção de *Listeria monocytogenes*.
- NF XP V 08-102 (1998) – MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS – Règles generales pour le comptage des colonies et pour l'expression des resultats.