

Unidade VIII

Controlo microbiológico de alimentos

Dorit Schuller

1. Preparação de amostras	2
2. Isolamento de bactérias produtoras de iogurte	4
3. Análise microbiológica de produtos lácteos	6

Durante o seu processo de fabrico os alimentos sofrem manipulação, transporte e contacto com diferentes tipos de superfícies (equipamento, utensílios, mãos, embalagens, etc.) mais ou menos contaminadas com microrganismos. O elevado número de microrganismos que se pode transmitir aos alimentos e a sua natureza, pode ter graves consequências, quer em termos de saúde pública, quer em termos de deterioração futura dos produtos alimentares. Não admira pois, que o controlo microbiológico destes produtos assuma um papel determinante em tecnologia alimentar e constitua um dos melhores meios para testar numa unidade industrial a eficácia das operações de lavagem, os processos de desinfecção e a higiene pessoal dos operários.

A determinação da flora microbiana "total" de um produto alimentar é o meio mais usado para avaliar a sua qualidade microbiológica. A determinação da qualidade pode ser feita, quer através do método clássico da enumeração em placas, quer por métodos modernos de análise microbiológica como a impedimetria, luminometria microcalorimetria, redução de corantes, métodos moleculares e imunológicos.

Neste trabalho iremos destacar a presença de microrganismos em diversos alimentos, e tentar compreender a sua importância quer no processo de fabrico, quer na deterioração.

1. Preparação de amostras

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

O procedimento utilizado para produtos sólidos consiste vulgarmente, na trituração da amostra sólida, em presença de um meio de diluição, recorrendo-se normalmente a um triturador eléctrico com pás giratórias, movendo-se a alta velocidade. No entanto, este método embora seja o vulgarmente utilizado, não é o mais correcto do ponto de vista microbiológico, porque:

- o movimento das pás do triturador, já que o processo ocorre a alta velocidade, provoca libertação de calor podendo afectar a flora microbiana presente;

- o movimento das pás do triturador pode fragmentar possíveis estruturas filamentosas dos microrganismos presentes (hifas de fungos, bactérias agrupadas, pseudomicélio de leveduras, entre outras), conduzindo a uma estimativa por excesso, do número de microrganismos presentes.

As condições de homogeneização terão de ser uniformizadas para que os resultados possam ser comparados. A velocidade do triturador deve estar compreendida entre 8000 e 45000 rpm e o tempo de homogeneização deve ser o suficiente, para se conseguir um total de 15-20 000 rotações.

Tentando minimizar o efeito da trituração por este processo, desenvolveu-se um outro processo mecânico mais suave. Para isso, deve colocar-se a amostra na presença de um agente diluidor dentro de um saco esterilizado. Embora este processo não afecte significativamente as possíveis estruturas filamentosas presentes no interior da amostra, não permite uma homogeneização tão perfeita da mesma.

Outro factor a ter em conta quando se realiza uma homogeneização, é o agente diluidor escolhido. Muitas vezes as soluções a utilizar são: soluções salinas, solução de Ringer, tampão fosfato, água destilada estéril ou água peptonada. No entanto estas soluções podem por vezes ser tóxicas para alguns microrganismos, particularmente quando se prolonga de forma excessiva o seu tempo de contacto. Assim, o agente diluidor mais utilizado tem sido a água peptonada (0,1% de peptona, p/v), ou uma solução salina.

	<i>Preparação da amostra de alimentos sólidos</i>
--	---

1. Pesar a quantidade de amostra necessária em condições de assépsia (segundo as Normas Portuguesas, 10 gramas é o mais usual).
2. Juntar o volume do meio de diluição de forma a obter uma diluição de 1/10 (p/v). Utilizar uma proveta graduada estéril.
3. Colocar a amostra no homogeneizador (a velocidade de homogeneização não deve ultrapassar as 45000 rpm e o tempo de homogeneização deve ser o suficiente para se obter um total de 15-20000 rotações).
4. Deixar em repouso à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

5. Após este período de repouso, proceder com brevidade às diluições necessárias para as diferentes análises e, logo de seguida, às respectivas sementeiras. Usar os meios de cultura mencionados mais adiante.

	<i>Preparação da amostra de alimentos líquidos</i>
--	--

1. Medir numa proveta estéril, 100 ml de líquido a analisar.
2. Proceder a diluições, caso necessário, usando para isso tubos de ensaio contendo água desionizada previamente esterilizados.
3. Proceder à sementeira em meios de cultura apropriados. Usar os meios de cultura mencionados mais adiante.

2. Isolamento de bactérias produtoras de iogurte

O fabrico do iogurte inicia-se a partir de leite, ao qual se pode ainda adicionar leite em pó. Esta mistura é homogeneizada, pasteurizada e arrefecida. Inocula-se então com uma cultura mista de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. O material inoculado é incubado a uma temperatura entre 40° e 46°C. Os microrganismos mencionados produzem grandes quantidades de ácido láctico, através de uma fermentação homoláctica. Este processo metabólico conduz ao abaixamento do pH do leite, causando a sua coagulação e inibindo o crescimento de bactérias que não toleram meios ácidos. Tanto *Lactobacillus bulgaricus* como *Streptococcus thermophilus* têm células imóveis, não formam esporos e são microrganismos Gram positivos. Enquanto a primeira espécie apresenta células em forma de bastonete longo que aparecem frequentemente em cadeias, *Streptococcus thermophilus* consiste em células esféricas ou ovoides, que ocorrem em pares ou cadeias longas.

Com este trabalho pretende isolar-se os dois tipos de bactérias que se encontram no iogurte e posteriormente produzir novamente iogurte, usando as culturas puras como inóculo.

	<i>Isolamento de bactérias</i>
--	--------------------------------

Exame microscópico

1. Tirar 2 ansas de iogurte para um tubo com 5 ml de água desionizada estéril.
2. Transferir uma gota de iogurte homogeneizado para uma lâmina desengordurada.
3. Secar ao ar.
4. Fazer a coloração pelo método de Gram (ver Unidade II).

Isolamento

1. Tirar 2 ansas de iogurte para um tubo com 5 ml de água desionizada estéril.
2. Fazer placas de isolamento em meios apropriados para isolamento de microrganismos presentes no iogurte (Meios M17 e MRS, conforme composição em anexo).
3. Selar as placas com *parafilm*, para evitar a secagem do meio, e incubar a 40°C durante 1-2 dias.
4. A partir das colônias obtidas, fazer coloração de Gram e confirmar ao microscópio a existência dos dois tipos de bactérias. Por vezes, e dependendo da marca do iogurte, apenas se observa uma espécie de bactérias.

Produção de iogurte

1. Transferir 1 colônia de *Streptococcus thermophilus* e 1 colônia de *Lactobacillus bulgaricus* para um balão de Erlenmeyer com 50 ml de leite fresco fervido e arrefecido a 45°C.
2. Agitar a mistura e incubar o balão durante 10 horas num banho termostático a 45°C. Guardar depois o balão no frigorífico, durante 1 dia.
3. Após obtenção do iogurte fazer novamente um esfregaço e proceder à coloração de Gram.

3. Análise microbiológica de produtos lácteos

O presente trabalho tem por objectivo a avaliação da flora microbiana presente em produtos lácteos, como iogurte ou queijo fresco, pelo método de homogeneização, espalhamento em placa com meio de cultura apropriado e posterior contagem dos microrganismos presentes.

	<i>Procedimento</i>
--	---------------------

Contagem de microrganismos totais

1. Colher a amostra para análise microbiológica (10 g de iogurte ou queijo fresco).
2. Homogeneizar a amostra usando água peptonada.
3. Proceder a diluições decimais sucessivas com água peptonada.
4. Após as diluições realizadas, proceder à sua sementeira nas placas com meio Plate Count Agar, pipetando, para cada uma de 6 secções (previamente marcadas no fundo da placa) 0,05 ml de cada diluição.
5. Identifique as placas. Coloque-as em posição invertida na estufa às temperaturas indicadas (4°C; 25°C; 40°C). Registe as observações ao fim de 1, 2 e 3 dias de incubação.

Contagem de bactérias coliformes

1. Proceder de modo idêntico ao referenciado anteriormente, utilizando os meios Chromocult Coliform Agar ou Endo Agar. Colocar as placas à temperatura de 37°C.
2. Observe e quantifique o número de colónias de bactérias coliformes e de *Escherichia coli* desenvolvidas em cada meio de cultura.
3. Ao microscópio confirmar a morfologia típica das células bacterianas e faça a coloração de Gram.

Contagem de leveduras

1. Proceder de modo idêntico ao referenciado anteriormente, utilizando meio YEPD com cloranfenicol. Colocar as placas à temperatura de 30°C durante 1 a 2 dias.
2. Observar e quantificar o número de colónias desenvolvidas.
3. Ao microscópio confirmar a morfologia típica das células de levedura.

	<i>Meios de cultura e soluções</i>
--	------------------------------------

Composição de meios de cultura**Plate Count Agar**

Meio de cultura para a enumeração de microrganismos. Composição do meio:

Peptona de caseína	5,0 g/l
Extracto de levedura	2,5 g/l
Glucose	1,0 g/l
Agar	14,0 g/l

Endo Agar

Meio de cultura para a enumeração de bactérias coliformes. Composição do meio:

Triptose	10,0 g/l
Peptona de carne	5,0 g/l
Peptona de caseína	5,0 g/l
Extracto de levedura	1,5 g/l
Cloreto de sódio	5,0 g/l
Hidrogenofosfato de potássio	4,375 g/l
Dihidrogenofosfato de potássio	1,375 g/l
Lactose	12,5 g/l
Desoxicolato de sódio	0,1 g/l
Laurilsulfato de sódio	0,05 g/l
Fucsina básica	1,05 g/l
Sulfito de sódio	2,1 g/l
Agar	14,0 g/l

Chromocult Coliform Agar

A "mistura cromogénica" incorporada no meio desidratado permite a detecção simultânea de *Escherichia coli* e de outras bactérias coliformes em alimentos.

Identificação de bactérias coliformes

A β -D-galactosidase, enzima específica de bactérias coliformes hidroliza o composto "Salmon-GAL", que faz parte da mistura cromogénica. O produto da hidrólise é um composto corado de vermelho pelo que as colónias de bactérias coliformes aparecem de cor vermelha.

Identificação de *Escherichia coli*

A β -D-glucuronidase, enzima específica de *E. coli* hidroliza o composto "X-glucuronide", que faz parte da mistura cromogénica. Como *E. coli* faz parte do grupo de bactérias coliformes, possui também a β -D-galactosidase, que hidroliza o composto "Salmon-GAL". As colónias de *E. coli* aparecem de cor azul escuro - violeta, devido aos dois compostos corados produzidos pela hidrólise enzimática de dois compostos cromogénicos.

Outras Enterobactérias

Algumas espécies do género *Salmonella* que possuem a β -D-glucuronidase podem dar origem à formação de colónias de cor azul - turquesa. Outras Enterobacteriaceas apresentam colónias incolores.

Composição

Peptonas	3,0 g/l
Cloreto de sódio	5,0 g/l
Dihidrogenofosfato de sódio	2,2 g/l
Hidrogenofosfato de sódio	2,7 g/l
Piruvato de sódio	1,0 g/l
Triptofano	1,0 g/l
Tergitol 7	0,15 g/l
Sorbitol	1,0 g/l
Mistura cromogénica	0,2 g/l
Agar	12,0 g/l

Meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) com cloranfenicol

Meio de cultura para a enumeração de leveduras. Composição:

Extracto de levedura	2,5 g/l
Peptona	20 g/l
Glucose	10 g/l
Cloranfenicol	0,1 g/l
Agar	20 g/l

Meio M17

Meio de cultura para o isolamento de *Streptococcus*. Composição:

Triptona	2,5 g/l
Peptona	2,5 g/l
Peptona de soja	5,0 g/l
Extracto de levedura	2,5 g/l
Extracto de carne	5,0 g/l
Lactose	5,0 g/l
Glicerofosfato de sódio	19,0 g/l
Sulfato de magnésio	0,25 g/l
Ácido ascórbico	0,50 g/l
Agar	15 g/l

Meio MRS Agar

Meio de cultura para o isolamento de *Lactobacillus*. Composição:

Peptona	10,0 g/l
Extracto de carne	10,0 g/l
Extracto de levedura	5,0 g/l
Glucose	20,0 g/l

Tween 80	1,0 ml/l
Hidrogenofosfato de potássio	2,0 g/l
Acetato de sódio	5,0 g/l
Citrato de diamónio	2,0 g/l
Sulfato de magnésio	0,2 g/l
Sulfato de manganês	0,05 g/l
Agar	15 g/l

Água peptonada (peptona, 0,1%, p/v)

<i>Tópicos de discussão</i>

- Quais são os cuidados a ter na preparação de uma amostra alimentar para análise microbiológica?
- O que indica a presença de bactérias coliformes em produtos lácteos?
- Quais são os cuidados a ter para evitar a contaminação de alimentos durante o seu processo de fabrico, manipulação e transporte?

<i>WWW</i>

- <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/educate.html>
- <http://www.bacteriamuseum.org/niches/foodsafety/foodsafety.shtml>