

ESCOLA TÉCNICA CURSO NOBRE



**CONTROLE DE FERMENTAÇÃO E
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA**

www.cursonobre.com.br

Índice

1	Noções de Microbiologia...	2
2	Meios de Cultura.....	9
3	Desenvolvimento Microbiano.....	12
4	Infecção no Processo de Fermentação.....	14
5	Técnicas em Microbiologia ...	14
6	Controle Microbiológico da Fermentação	18
7	Controle Microbiológico de Águas	30
8	Análises Microscópicas - Viabilidade e Gram... ..	33
9	Delta pH e Delta Acidez.....	40
10	Força Fermentativa.....	40
11	Referências Bibliográficas ...	43

1 Noções de Microbiologia

1.1 Introdução

Microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos e suas atividades.

Este estudo engloba a preocupação com a forma, a estrutura, a reprodução, a fisiologia, o metabolismo e a identificação dos seres microscópicos.

Está incluído também nesta ciência o estudo da distribuição natural dos microrganismos, suas relações recíprocas e com outros seres vivos, seus efeitos benéficos e prejudiciais sobre os homens e as alterações físicas e químicas que provocam em seu meio ambiente.

Em sua maior parte, a microbiologia trata com organismos microscópicos unicelulares. Nas formas superiores de vida, os organismos são compostos de muitas células, que constituem tecidos altamente especializados e órgãos destinados a exercer funções específicas. Nos indivíduos unicelulares, todos os processos vitais são realizados numa única célula. Independentemente da complexidade de um organismo, a célula é, na realidade, a unidade básica da vida.

Todas as células vivas são basicamente semelhantes (Figura 1.1). Compõem-se de protoplasma (do grego: a primeira substância formada), um complexo orgânico coloidal constituído, principalmente, de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos; o conjunto é circundado por membranas limitantes ou parede celular, e todos contêm um núcleo ou uma substância nuclear equivalente.

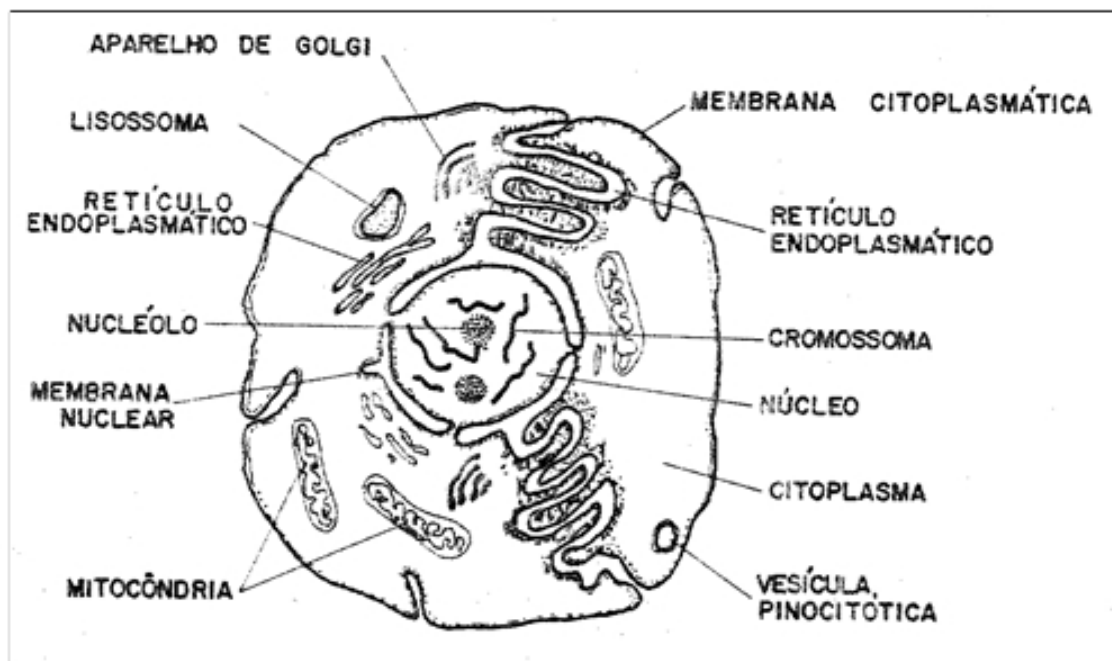


Figura 1.1 - Esquema de uma Célula Típica

1.2 Classificação dos microrganismos

Após sua descoberta, os microrganismos foram classificados nos dois reinos então existentes: animal e vegetal. Os protozoários foram incluídos no reino animal, os fungos e bactérias no reino vegetal. No entanto, essa classificação não era satisfatória, visto que entre os protozoários existem alguns grupos capazes de realizar fotossíntese, enquanto que os fungos e a maioria das bactérias, apesar de classificadas no reino vegetal, não são fotossintéticas.

Em 1986 modificou-se toda a classificação dos seres vivos quando o biólogo E.H. Haeckel propôs a criação de um terceiro reino, o reino protista, que incluiria todos os microrganismos com exceção do vírus.

Os seres vivos podem ser separados em 2 grandes grupos.

Em um primeiro grupo teríamos aqueles que só contém um tipo de ácido nucleico (DNA ou RNA) e seriam constituídos pelos vírus. Em um segundo grupo teríamos aquele, que contém dois tipos de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Este grupo seria subdividido em dois subgrupos. O primeiro incluiria organismos onde o material nuclear não é envolvido por membrana e seria constituído por organismos procarióticos: bactérias e algas cianofíceas. O segundo seria constituído por organismos que possuem uma membrana envolvendo o material nuclear; nesse grupo teríamos os organismos que não têm a capacidade de formar tecidos, os eucarióticos inferiores: fungos, mixomicetos, algas superiores, protozoários e aqueles que têm capacidade de formar tecidos, os eucarióticos superiores: plantas e animais.

Segundo Haeckel, o reino protista seria subdividido em dois grandes grupos (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Classificação do Reino Protista

Reino Protista	
Protistas Inferiores (Procarióticos)	Protistas Superiores (Eucarióticos)
	Algas superiores
Bactérias	Mixomicetos
Algas cianofíceas	Fungos
	Protozoários

Os protistas procarióticos e eucarióticos apresentam várias diferenças com relação as estruturas celulares. A organização celular das células procarióticas é bem mais simples quando comparada com as células eucarióticas. Na Tabela 1.2 estão relacionadas as principais diferenças entre as células procarióticas e eucarióticas.

Tabela 1.2 - Principais Diferenças entre Células Procarióticas e Eucarióticas

	Célula Procariótica	Célula Eucariótica
Estrutura nuclear	Ausência de membrana	Presença de membrana
	DNA circular	DNA linear
	Não contém histona	Contém histona
	Ausência de nucléolo	Presença de nucléolo
DNA em organelas	Ausente	Presente
Mitocôndrias	Ausente	Presente
Cloroplastos	Ausente	Presente às vezes
Retículo endoplasmático	Ausente	Presente
Estrutura flagelar 9-2	Ausente	Presente
Ribossomos citoplasmáticos	70 S*	80 S
Estrutura de Golgi	Ausente	Presente
Movimento amebóide	Ausente	Presente às vezes
Pinocitose	Ausente	Presente às vezes
Fagocitose	Ausente	Presente às vezes

* S - Unidade Svedberg (coeficiente de sedimentação)

1.3 Morfologia e estrutura dos microrganismos

1.3.1 Bactérias

O tamanho de uma célula bacteriana é caracteristicamente pequeno. O diâmetro das bactérias esféricas varia de 0,5 a 4 μ m, enquanto que o comprimento de bactérias cilíndricas raramente ultrapassa 10 μ m.

Quanto a forma, a maioria das bactérias pode ser classificada em três tipos fundamentais: bactérias esféricas, cilíndricas e espiraladas (Figura 1.3).

Bactérias esféricas - Denominam-se cocos e podem se apresentar em agrupamentos: diplococos (pares) estreptococos (cadeias), estafilococos (cachos irregulares), tetrádenos (grupos de quatro) e sarcina (grupos cúbicos); o cocos que permanecem isolados denominam-se micrococos.

Bactérias cilíndricas - Recebem o nome de bacilos as bactérias em forma de bastonetes. Podem se apresentar em cadeias (estreptobacilos) ou isoladas.

Bactérias espiraladas - Denominam-se vibriões, quando têm o corpo rígido e uma só volta de espiral (parecem bacilos curvos); espirilos, quando têm o corpo rígido e várias voltas de espiral; espiroquetas quando têm corpo flexuoso e vários espirais.

A reprodução nas bactérias é feita, na grande maioria dos casos, pelo processo da divisão binária simples, na qual uma célula adulta divide-se ao meio dando duas células-filhas iguais. Em alguns casos a reprodução é por brotamento, quando uma célula emite um broto menor que ela, que se destaca constituindo a nova célula.

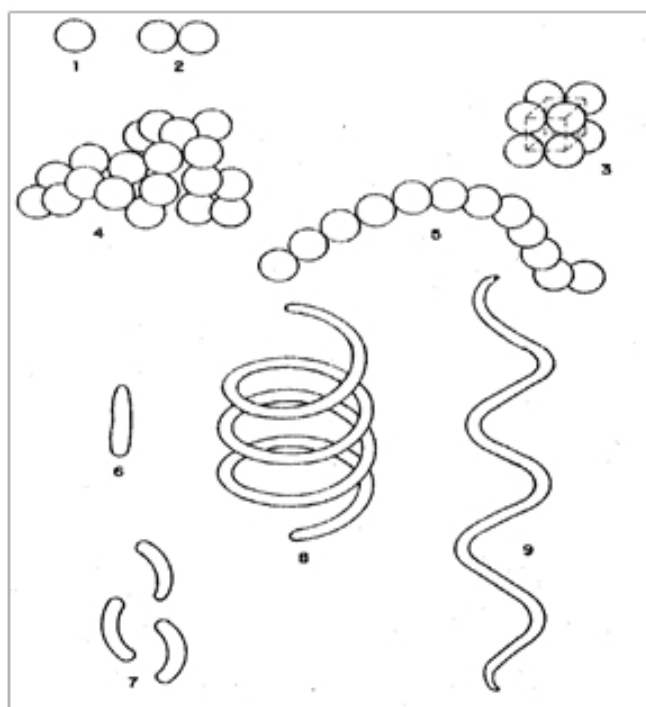


Figura 1.2 - Tipos Morfológicos Fundamentais das Bactérias. 1-Coco Isolado, 2-Diplococo, 3-Sarcina, 4-Estafilococos, 5-Estreptococos, 6-Bacilo, 7-Vibrações, 8-Espiroqueta e 9-Espirilo.

1.3.2 Fungos

Bolores

Do ponto de vista morfológico, é conveniente distinguir os fungos em dois grandes grupos: os bolores e as leveduras.

Os bolores caracterizam-se por formarem um micélio, que é um conjunto de estruturas filamentosas denominadas hifas.

As hifas são estruturas cenocíticas, isto é, multinucleadas, mas não há separação entre células (o citoplasma é contínuo).

Em alguns bolores as hifas são septadas, mas tais septos são incompletos, persistindo, portanto, a continuidade do citoplasma.

Os bolores podem se reproduzir de duas maneiras: assexuada e sexuada. No 1º caso o processo normal é a esporulação. No 2º caso os esporos são formados pela união de duas células e fusão de seus núcleos, seguida de divisão, o que produz um número variável de células.

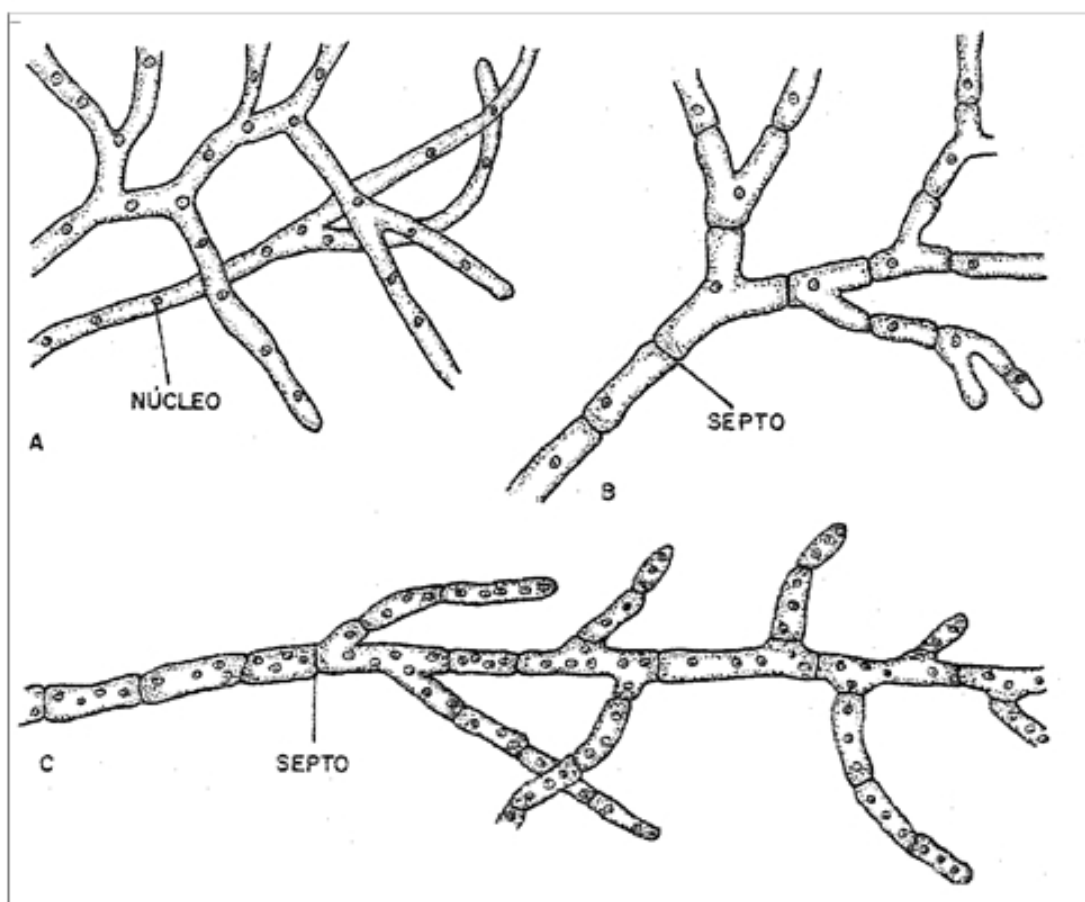


Figura 1.3 - Hifas de Bolores: (A) Não Septadas e Multinucleadas, (B) Septadas com Células Mononucleadas, (C) Septadas com Células Multinucleadas.

Leveduras

As leveduras são fungos geralmente unicelulares. Seu tamanho varia bastante, de 1-5 μ m de diâmetro a 5-30 μ m de comprimento. Sua forma também é muito variável, desde elementos esféricos

até células elípticas bastante alongadas. Suas células apresentam as características dos seres eucarióticos.

Tem membrana citoplasmática lipoprotéica, cuja principal função é regular as trocas com o meio ambiente. Possuem, também, uma parede celular rígida, constituída principalmente de dois polissacarídeos: manana e glucana, além disso, contêm proteínas e lipídeos.

No citoplasma encontram-se, além dos componentes usuais em solução, um ou mais vacúolos, delimitados por uma membrana, mitocôndrias - estruturas membranosas relacionadas com processo respiratório; retículo citoplasmático; ribossomos e, freqüentemente, grânulos de material de reserva - hidratos de carbono, gorduras ou proteínas. O núcleo, tipicamente eucariótico, é envolvido por uma membrana nuclear.

Assim como os bolores, as leveduras podem se reproduzir assexuada e sexuadamente. No primeiro caso o processo mais comum é o brotamento, do qual resultam células-filhas inicialmente menores que a célula-mãe.

Algumas leveduras reproduzem-se por divisão binária, à semelhança das bactérias.

A reprodução sexuada se faz pela formação de ascasporas, isto é, esporas contidas no interior de um asco.

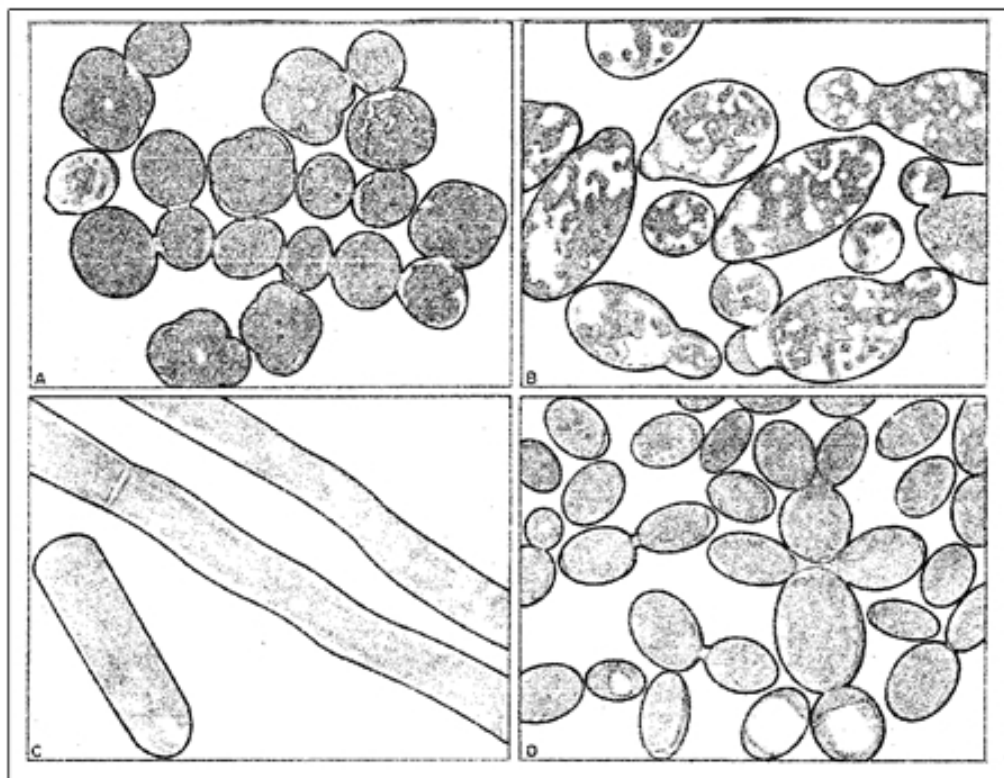


Figura 1.4 - Morfologia de Diferentes Tipos de Levedura: (A) *Sacharomyces Cereviae*, (B) *Sacharomyces Ludwigii*, (C) *Geotrichum Candidum* e (D) *Pichia Membranaefaciens*.

1.4 O microscópio

Embora seja um equipamento relativamente simples, o microscópio desempenha um papel fundamental nas análises microbiológicas e como tal torna-se necessário o conhecimento de conceitos básicos para sua adequada utilização.

Na Figura 1.4.1 está mostrada a seção transversal de um microscópio simples, mostrando as partes mais importantes.

1.4.1 Características de um bom microscópio

Para ser satisfatório um microscópio deve dar um aumento adequado.

Ele deve aumentar o objeto de forma que os detalhes apareçam separados o suficiente para que sejam visíveis. O aumento em geral vem marcado nas objetivas (10X, 45X, 100X) e nas oculares (5X, 10X, 15X). Um microscópio deve também apresentar boa definição e alto poder de resolução.

"Definição" é sinônimo de contraste e depende da qualidade das lentes. As lentes comuns (acromáticas) tem defeitos: a aberração esférica e a aberração cromática, devido à propriedade dos raios de luz de diversas cores serem "refratados" em ângulos diferentes, sendo os de menor comprimento de onda (azul, violeta) mais refratados que os de maior (vermelho, laranja). É possível corrigir parcialmente estas aberrações usando vidros especiais, porém, estas lentes comuns são normalmente usadas nos microscópios para trabalho de rotina. Por este motivo deve-se tomar cuidado ao comparar observações microscópicas do mesmo material em microscópios diferentes.

E possível melhorar o contraste por exemplo através do coramento (tingimento) do objeto (com corantes púrpura ou verde-azulados) ou através de campo escuro e contraste de fase.

"Poder de resolução" é a habilidade de produzir imagens separadas de partes do objeto que estão muito próximas, isto é, a habilidade de distinguir detalhes do objeto.

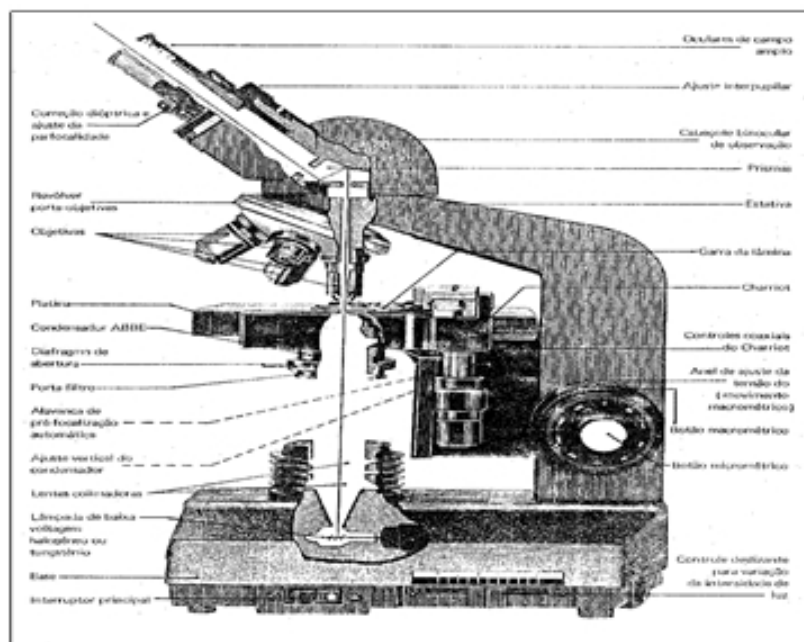


Figura 1.5 - Microscópio

Sabe-se que além das características próprias dos microrganismos (se são bactérias, leveduras, fungos,...), vários outros fatores influenciam na cinética de crescimento celular. Entre esses fatores um dos mais importantes é o meio de cultura onde os microrganismos são colocados.

O meio de cultura deve conter todos os elementos essenciais necessários ao crescimento do microrganismo, em proporções similares às que ocorrem na célula. Entre estes elementos costumase distinguir entre macronutrientes - C, H, N e O; mesonutrientes - Mg, P, S e micronutrientes - Fe, Cu, Zn, Mo, Co, etc.

A Tabela 2.1 apresenta as composições médias dos principais elementos que constituem as células microbianas.

As formas pelas quais estes elementos devem ser fornecidos aos microorganismos são extremamente variáveis, dependendo do microrganismo e do que se deseja, porém, a maior parte dos microrganismos crescem bem em meios compostos de substâncias orgânicas complexas.

Tabela 2.1 - Componentes das Células Microbianas

Elementos	Função Fisiológica	% sobre o Peso Seco
Hidrogênio	Presente em compostos orgânicos e na água	8
Oxigênio	Presente em compostos orgânicos e na água	20
Carbono	Presente nos compostos orgânicos	50
Nitrogênio	Presente nas proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas	máx. 14 min. 3
Enxofre	Proteínas e vários coenzimas	1
Fósforo	Ácidos nucleicos, fosfolípidos e coenzimas	3
Magnésio	Cofator em várias reações enzimáticas (ATP)	0,5
Manganês	Cofator de várias enzimas	0,1

Elementos	Função Fisiológica	% sobre o Peso Seco
Cálcio	Cofator de enzimas (proteases)	0,5
Ferro	Citocromos, algumas proteínas, cofator de enzimas	0,2
Cobalto	Vitamina B12	0,03
Cobre		
Zinco	Presente em algumas enzimas	0,03
Molibdênio		

2.1 Classificação dos meios

De uma forma geral os meios se classificam em:

- Líquidos;
- Semi-sólidos (Pastosos: amido, grãos moídos, etc.);
- Sólidos (batata, cenoura ou agar, gelatina).

Os meios ainda podem ser:

- Sintéticos (composição conhecida);

- Não sintéticos (substâncias orgânicas complexas).

Os meios mais usados em laboratório para manutenção e isolamento de microrganismo é o saboraud (glicose - peptona - extrato de carne - agar).

Glicose : É a fonte de carbono e energia.

Peptonas : É a fonte de nitrogênio. É um hidrolisado enzimático de proteínas. Contém fosfatos.

Extrato de carne : Preparado a partir de carne magra. Fornece substâncias que ativam o crescimento dos microrganismos.

Fórmula:

- Extrato de carne	0,9 g
- Peptona	1,5 g
- Glicose	3,0 g
- Agar	8,0 g
H ₂ O destilada	300 ml

Agar : Polissacarídeo extraído com água quente de algumas espécies de algas marinhas (agarófitas): gelidium amansii.

Minerais : Em geral fornecidos pela água e impurezas dos componentes do meio.

2.2 Classificação dos nutrientes

Os nutrientes necessários ao crescimento também podem ser classificados como:

- Elementos principais : C, H, N, O
- Elementos acessórios : P, K, S, Mg
- Vitaminas e hormônios
- "Traços de elementos"

Costuma-se também usar a expressão fatores de crescimento para designar certos nutrientes orgânicos, tais como os aminoácidos e vitaminas que são incorporados diretamente à estrutura celular.

Os microrganismos e células de tecidos foram inicialmente cultivados em meios "naturais", feitos com extratos de plantas ou animais, por exemplo, suco de uva, leite, "corn steep liquor" (líquido proveniente da extração de glicose do milho), peptonas e soro de sangue de animais. Ainda hoje estes meios apresentam alguma conveniência porque são fontes de todos os 4 grupos de nutrientes, porém, eles são indefinidos e variáveis quanto à composição. Para que possamos estudar a nutrição dos microrganismos temos que usar, na medida do possível, meios quimicamente definidos ou chamados "sintéticos".

Um meio mínimo contém somente os nutrientes essenciais para o crescimento, enquanto que o meio rico (completo) é aquele no qual os nutrientes essenciais são complementados por fontes alternativas de elementos, tais como aminoácidos, vitaminas, precursores de ácidos nucleicos e outros intermediários da síntese celular. O enriquecimento do meio de cultura pode aumentar a velocidade

de crescimento e alterar a composição enzimática dos microrganismos. É por este fato que temos de definir o meio de cultura antes de estudar qualquer outra influência sobre os microrganismos.

As necessidades nutricionais de um organismo pode variar qualitativamente ou quantitativamente de acordo com as condições de crescimento. Por exemplo, a temperatura pode afetar as necessidades de fatores de crescimento, e o pH e a concentração total de nutrientes (osmolaridade) também afetam a nutrição dos microrganismos.

Em geral, para iniciar o crescimento usando um inóculo pequeno necessita-se de um meio mais rico do que quando se inocula com grandes quantidades de células.

Fontes de nitrogênio:

- As fontes de nitrogênio que podem ser utilizadas pelos diferentes microrganismos inclui a maioria, sendo todas formas orgânicas do nitrogênio.
- O nitrogênio é utilizado pelas células para a síntese das proteínas, ácidos nucleicos e polímeros da parede celular (3 a 14% do peso seco).

Aminoácidos:

- Frequentemente os aminoácidos são fatores de crescimento. Para a síntese de proteínas e para outros usos são necessários as formas L, porém, algumas vezes necessita-se também das formas D para a parede celular (isomeria), levando-se também em consideração que a própria célula pode promover a "racemização" dos isômeros, de acordo com suas necessidades.
- Aminoácidos individuais representam entre 1 a 5% da proteína celular.
- Algumas vezes, pequenas cadeias de aminoácidos (peptídios) são mais eficientes como fatores de crescimento do que isolados.
- Resta ainda afirmar que para alguns microrganismos os aminoácidos são inibidores de crescimento, dependendo de sua concentração.
- Fontes de vitaminas e hormônios

O termo vitamina é em geral empregado para designar os outros fatores de crescimento que não aminoácidos.

As vitaminas são classificadas em dois grupos lipossolúveis e solúveis em água. Ao primeiro grupo (gordura) pertencem as vitaminas A, D, E, K, ubiquinona, colesterol e ácidos graxos insaturados (as vitaminas A, D, e E não têm importância para os microrganismos).

As solúveis em água são: ácido ascórbico (C), tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido nicotínico, biotina, ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, cobalamina, ácido mevalônico colina e meso-inositol (todos estes são importantes na nutrição de microrganismos, à exceção da vitamina C).

Num meio semi-sintético costuma-se usar extrato de carne ou de leveduras como fonte de vitaminas.

Uma ou várias deficiências de vitaminas podem levar a efeitos marcantes sobre o metabolismo dos microrganismos, por exemplo, fazendo acumular subprodutos no meio ou simplesmente

permitir o crescimento dos mesmos, apesar de todos os outros elementos estarem presentes no meio.

Os hormônios são mais importantes no cultivo de células de mamíferos e de plantas do que para o cultivo de microrganismo.

– Fontes de fósforo

Em geral é suprido na forma de um fosfato inorgânico. É incorporado (como fosfato) nos ácidos nucleicos, fosfolípidos e polímeros da parede celular. O conteúdo de fósforo aumenta com o aumento da velocidade de crescimento e varia inversamente com a temperatura.

– Fontes de Na e K

A maior parte de potássio celular parece estar ligado ao RNA sendo necessário cerca de 60 g de matéria seca/gramas de potássio. Assim como o fósforo, as necessidades de potássio variam com as variações no RNA (temperaturas, velocidade de crescimento, etc.). Os íons de potássio funcionam como enzimas.

Quanto ao sódio ainda não foi quantificada a sua influência, porém, em alguns microrganismos existem grandes quantidades de Na e por isso são chamados de halofílicos.

– Fontes de Mg

O fator de conversão no Mg está em torno de 300 a 900 g de peso seco/g de magnésio e é inversamente proporcional ao RNA.

– Fontes de S

$Y_x/\text{enxofre} = 300 \text{ g massa seca/g enxofre.}$

Em geral está presente na forma inorgânica como sulfato. É utilizado na síntese de proteínas.

– Traços de elementos

Pequenas quantidades de um grande número de elementos têm grande importância no crescimento. Estes elementos estão entre os números 4 (Be) e 74 (W) e quase todos entre 4 e 35 (Br). São supridos como impurezas nos outros componentes dos meios e na água.

Os mais freqüentes são: Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn.

3 Desenvolvimento Microbiano

3.1 Importância da medida quantitativa do crescimento

Tomamos contato com os microrganismos praticamente em todos os instantes e locais onde nos encontramos.

Sabemos que existem microrganismos no ar, pois muitas das infecções a que somos sujeitos provêm da atividade de microrganismos que anteriormente estavam em suspensão no ar, assim como existem microrganismos no solo, nos alimentos, etc.

Muitas vezes é fácil verificar a atividade dos microrganismos, por exemplo na deterioração dos alimentos, na fermentação de bebidas que contém açúcar, na transformação do vinho em vinagre,

etc., porém quando estamos interessados em controlar a atividade destes microrganismos é necessário quantificar o seu crescimento, através da medida da biomassa presente.

Na natureza esta quantificação é extremamente difícil, pois estão presentes muitas espécies, o meio onde os microrganismos se desenvolvem é extremamente heterogêneo, existindo muitas substâncias (substratos), que podem ser aproveitadas pelos microrganismos e existem ainda alterações entre as diversas espécies (ou seja, a maior ou menor quantidade de indivíduos de uma determinada espécie pode condicionar o número de indivíduos de outras espécies).

Mesmo nos processos industriais onde se procura trabalhar com culturas puras (um só microrganismo), a variação de condições físicas como a temperatura, pH, pressão, existência ou não de iluminação, entre outras, pode afetar drasticamente o desenvolvimento dos MO = microrganismos.

Portanto, a escolha do método de medida é uma das mais importantes decisões que devem ser tomadas para o estudo de qualquer fenômeno onde estejam presentes organismos vivos. Os fatores que influenciam esta escolha são:

- As propriedades da biomassa;
- As propriedades do meio de cultura;
- A precisão requerida;
- A sensibilidade requerida;
- A rapidez da medida.

3.2 Métodos de medida de desenvolvimento microbiano

De uma forma geral os métodos de medida do desenvolvimento microbiano podem ser divididos em 4 grupos:

- Contagem de microrganismos
 - Diretamente se faz através do uso de microscópio com metodologia e material padronizado.
 - Indiretamente se faz através de plaqueamento, contando as colônias crescidas em meios padronizados para cada caso (cada célula deve dar origem a uma colônia).
- Efeito que o microrganismo provoca no meio ambiente - baseia-se na medida de produtos formados ou nutrientes consumidos pelo microrganismo. Ex.: gases, ácidos, açúcares.
- Medida de massa de células
 - Diretamente - determinação da concentração de células em gramas (de matéria seca) por litro de suspensão.
 - Indiretamente - por turbidimetria.
- Colorimetria - Baseia-se na adsorção de certos corantes por células de microrganismos.

4 Infecção no Processo de Fermentação

O caldo de cana oferece condições naturais e altamente nutritivas, ricas em matéria orgânica e inorgânica, que são ideais para o crescimento de uma grande variedade de microrganismos. Por isso, não é surpresa encontrar tais microrganismos se desenvolvendo durante a extração e o processamento da cana, originárias do solo, os quais aderem-se aos colmos, às folhas; da própria flora epifita da cana; da água de lavagem e de diluição, contaminantes do ar.

Condições relativamente típicas prevalecem em vários estágios do processo, o que seleciona o desenvolvimento de certos microrganismos; por exemplo, o pH do caldo favorece microrganismos acidófilos como *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, enquanto que a alta temperatura, associada aos valores de pH, favorecem o crescimento dos termofílicos como as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Um grande prejuízo está relacionado à degradação da sacarose, que é o principal nutriente utilizado pela célula para o rápido desenvolvimento celular.

De acordo com os produtos resultantes do metabolismo celular as bactérias são denominadas homofermentativas, quando o principal metabólito é o ácido láctico e heterofermentativas, quando além do ácido láctico também são formados quantidades apreciáveis de outros ácidos orgânicos, bem como álcool e CO₂. Também outros compostos de alto peso molecular podem aparecer com o resultado do metabolismo microbiano, tais como o dextrâneo e o levâneo que são produzidos por espécies de *Leuconostoc* e *Bacillus*, respectivamente.

Além dos produtos do metabolismo como os ácidos e as gomas, as bactérias também podem interferir no processo fermentativo por utilizar o álcool como fonte de carbono, desdobrando-o em ácido acético. Assim, as bactérias além de consumir o açúcar que poderá ser fermentado, afetam o processo lançando substâncias tóxicas que matam as leveduras ou ainda outras substâncias que fazem com que as leveduras floculem.

As bactérias contaminantes das fermentações têm sido divididas por alguns autores em 3 categorias ou seja:

- Espécies produtoras de goma;
- Espécies aeróbias produtoras de esporos;
- Espécies aeróbias não produtoras de esporos.

Essas bactérias podem ainda ser mesofílicas ou termofílicas, isto é, aquelas que crescem em temperaturas abaixo de 45°C e as que suportam temperaturas mais elevadas, acima de 45°.

5 Técnicas em Microbiologia

5.1 Introdução

Em um laboratório onde se realizam análises microbiológicas deve-se obedecer a uma série de normas que visam eliminar ou minimizar os riscos de contaminação, não só das amostras a serem analisadas como também dos manipuladores, visto que sempre existe a possibilidade de se estar trabalhando com material contaminado, inclusive por microrganismos patogênicos.

Já que o analista de microbiologia no seu dia-a-dia está permanentemente em contato com microrganismos patogênicos e não patogênicos, a observação destas normas visa, também, além do acima exposto, assegurar a exatidão dos resultados das análises efetuadas.

5.2 Normas de segurança e higiene pessoais

- Usar guarda-pó limpo.
- Deixar fora do laboratório abrigos, agasalhos, carteiras, pastas, livros, etc.
- Não participar do trabalho quando tiver feridas nas mãos (procurar protegê-la com curativo e luva).
- Não fumar, comer ou ingerir quaisquer espécie de líquidos no laboratório.

- Lavar as mãos antes e depois do trabalho.
- Não tocar com as mãos nos olhos, boca ou nariz.
- Não usar o guarda-pó para limpar lâminas, lamínulas ou quaisquer outros materiais.
- Tratar imediatamente quaisquer ferimentos provocados durante o trabalho (cortes, arranhões, etc.).
- Comunicar imediatamente qualquer suspeita de haver se contaminado, indicando o material ou cepa a qual estava trabalhando no momento.

5.3 Normas gerais de trabalho

- Planejar cada tarefa levando em consideração o tempo para execução e leitura da mesma, trabalhando sempre de forma metódica e ordenada.
- Limpar e desinfetar a bancada de trabalho antes e após terminar o trabalho.
- Anotar:

Identificação:

- Tipo de amostra;
 - Data e hora da tomada da amostra;
 - Data e hora da chegada ao laboratório;
 - Qualquer outra observação que se fizer necessária.
- Não esquecer os dados da análise propriamente dita, isto é:
 - Método utilizado;
 - Meios de cultura empregados;
 - Resultados obtidos, etc.
 - Em caso de derramar qualquer material suspeito, desinfetar e/ou esterilizar imediatamente o local e/ou material atingido.
 - O material contaminado deve ser colocado em recipientes especiais para posterior autoclavação.
 - As pipetas devem ser colocadas após o uso em recipiente com desinfetante.
 - Todo material utilizado deve seguir preferencialmente a seqüência de tratamento abaixo:
 - 1º) Esterilização (autoclave);
 - 2º) Lavar;
 - 3º) Secar;
 - 4º) Envolver em papel ou colocar em latas de inox apropriadas;
 - 5º) Esterilizar;
 - 6º) Armazenar.

- Ao sair do laboratório verificar se estão fechados registros de gás e água. Deixar todo o laboratório limpo e ordenado para o dia seguinte.

5.4 Esterilização e desinfecção assepsia

Esterilização:

De uma maneira geral, o termo esterilização implica no uso de agentes físicos e/ou químicos ou mecânicos para eliminar totalmente os organismos vivos de um material. Em contrapartida o termo desinfecção se entende pelo uso de agentes químicos germicidas para destruição da infecciosidade potencial de um dado material, não implicando, portanto, na eliminação total dos organismos vivos.

Assepsia é o conjunto de meios usados para impedir a presença de germes em local que não os contenha.

5.5 Técnicas de esterilização

Os agentes mais comuns utilizados para esterilização são:

5.5.1 Agentes físicos

- Calor úmido:

É a técnica preferencial para esterilização de todo material. Recomenda-se o uso da autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos.

Os meios de cultura deverão estar em frascos erlenmayer ou tubos de ensaio tampados com algodão e cobertos por papel de embrulho (kraft).

Os frascos vazios deverão estar tampados e cobertos com papel alumínio ou papel kraft.

- Calor seco:

A esterilização segura pelo calor seco requer uma temperatura de 170°C por 2 horas em estufa de esterilização ou forno Pasteur.

A esterilização por calor seco é normalmente usada para vidraria (placas de petri, pipetas) e metais, os quais deverão estar devidamente acondicionados em caixas ou latas de inox apropriadas.

- Radiação ultravioleta:

O efeito bactericida muito conhecido da luz solar se deve na realidade às irradiações ultravioletas. Quanto menor o comprimento de onda maior será sua ação bactericida. Este tipo de esterilização é normalmente usado para ambientes (câmara asséptica) durante aproximadamente 2 horas.

5.5.2 Agente mecânico

- Filtração

É uma técnica de esterilização utilizada para reagentes instáveis a altas temperaturas (antibióticos como cloranfenicol, clortetraciclina, penicilina e actidione). Esta filtração é feita em filtro de membrana de porosidade 0,45 m (millipore).

Todo dispositivo de filtração mais a membrana devem ser esterilizados em autoclave antes do uso.

5.5.3 Agentes químicos

No uso de agentes químicos ou desinfetantes podemos distinguir os mecanismos principais a saber:

- Dissolução dos lipídios da membrana celular (mediante o uso de detergentes lipossolubilizantes).
- Alterações irreversíveis das proteínas (mediante o uso de desnaturizantes, oxidantes, etc.).

Os diferentes agentes químicos chamados germicidas, quando contidos nas preparações químicas podem produzir:

5.5.3.1 Ação bactericida

O agente químico tem a propriedade de matar as bactérias, é uma ação irreversível porque mesmo que o agente químico seja removido, a bactéria morta não mais é capaz de se reproduzir.

5.5.3.2 Ação bacteriostática

O agente químico tem a propriedade de inibir a multiplicação das bactérias, mas quando o agente químico é removido a multiplicação é retomada.

Os principais germicidas usados são:

- Metanol-etanol;
- Compostos fenólicos;
- Glutaraldeído;
- Iodóforos;
- Álcoois;
- Quaternário de amônio;
- Composto de cloro;
- Formaldeído gás;
- Beta propielatone;
- Óxido de etileno;
- Organo sulfuroso.

Os desinfetantes acima mencionados têm finalidades de aplicação específicas para diferentes tipos de contaminação.

5.6 Técnicas de amostragem

- Para a amostragem de líquidos pode-se mergulhar o frasco (previamente esterilizado) diretamente no líquido, se estiver ao alcance das mãos.
- Em locais de difícil acesso a amostragem deve ser auxiliada por um recipiente provido de cabo ou cordão para atingir o produto, sendo que a primeira amostragem seria para "lavar" o frasco coletor e a segunda seria coletada no frasco estéril.

- Para a amostragem dos líquidos das tubulações deve-se utilizar os dispositivos especialmente construídos como "plugs", torneiras e outros locais de acesso. Neste caso, as primeiras porções do líquido devem ser desprezadas (30 seg.), recolhendo em seguida a amostra diretamente do frasco.

5.7 Acionamento e transporte das amostras

As amostras de diferentes produtos líquidos podem ser acondicionadas em frascos de vidro com tampas autoclaváveis e com volume de aproximadamente 500 ml.

- Para facilitar a homogeneização, o volume coletado não deve ser superior à metade do frasco.
- Os frascos devem ser previamente esterilizados em autoclave 121°C por 15 minutos tendo a região da tampa coberta por papel alumínio ou papel kraft.
- Em caso de transporte, os frascos de amostras devem ser acondicionados em caixas de isopor e envoltos com gelo picado.

Nestas condições, amostras podem ser mantidas por algumas horas sem o perigo de alteração sensível nas contagens microbianas.

6 Controle Microbiológico da Fermentação

6.1 Pontos de amostragem

Para acompanhamento microbiológico da usina, os seguintes pontos são destacados para a retirada de amostra:

- Água de lavagem de cana

Quando a lavagem de cana é feita por um sistema aberto, a amostragem deve ser feita antes e depois do lavador. No sistema fechado a diferença da qualidade microbiológica da água, antes e depois do lavador, é reduzida. A amostragem é convenientemente feita depois do lavador.

- Caldo misto

Amostras de caldo misto poderão ser recolhidas antes ou depois do crush-crush. Para amostragem homogênea é recomendado retirar as amostras na saída da caixa.

- Caldo antes de sulfitação ou calagem

Calagem, sulfitação e tratamento térmico são operações que reduzem a flora microbiana do caldo. A determinação da população microbiana antes desses tratamentos é aconselhável para avaliar o aspecto microbiológico das instalações de manejo de caldo, após a sua extração.

- Mosto

O grau de contaminação microbiana no mosto depende dos componentes que formam esse produto. Proporções e condições microbiológicas de caldo, xarope, melaço e outros ingredientes são essenciais na composição da flora do mosto. Quando a sua contagem microbiana estiver elevada, é desejável proceder a contagem dos componentes do mosto a fim de localizar a sua fonte.

- Pé-de-cuba

Uma das amostragens mais importantes para acompanhamento do processo fermentativo é a análise das condições microbiológicas do pé-de-cuba. A qualidade de fermentação depende essencialmente da qualidade do pé-de-cuba. As amostras são obtidas do pé-de-cuba pronto para ser adicionado nas dornas.

- Dornas em fermentação

As amostras das dornas em fermentação, durante diferentes etapas do ciclo, nos permitem acompanhar o processo.

- Dornas mortas

São amostras de vinho fermento durante a centrifugação.

- Leite de leveduras

Amostras do leite podem ser retiradas na saída da centrífuga ou na entrada dos tanques de levedura.

- Vinho centrifugado

Amostras do vinho centrifugado podem ser retiradas na saída da centrífuga.

- Água de diluição

Amostras da água utilizada para preparo no mosto podem ser obtidas em qualquer ponto de adição desse ingrediente: dornas, tanque de preparo do pé-de-cuba, etc.

- Caldo clarificado

Essa amostra pode ser obtida logo após o clarificador.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Aparelhos e utensílios

- Área de trabalho

Balcão com tampa de superfície plana, ampla e limpa. Sala bem iluminada, com boa ventilação, mas sem poeira e sem corrente de ar. A densidade microbiana do ar deve ser inferior a 15 colônias por placa, após exposição por 15 minutos.

- Autoclave

Pode ser horizontal ou vertical devendo ter boa exaustão do ar e permitir a operação a 121°C.

- Balança semi-analítica

Pode-se usar qualquer tipo com capacidade para 1 a 2 kg e precisão de pelo menos $\pm 0,1g$. Para pesagem dos antibióticos seria desejável uma precisão de $\pm 0,01g$.

- Potenciômetro para pH

Os diversos tipos existentes no mercado são satisfatórios. Aparelho com leitura até segunda casa decimal é desejável. Exemplo: pH = 4,05.

- Estufa para esterilização

De tamanho suficiente para evitar superlotação nas operações de esterilização das vidrarias. Aconselha-se operar com máximo de 50 a 75% da capacidade para aquela de convicção natural e 90% para a de convicção mecânica forçada.

- Incubador

O incubador deve ser adequadamente construído para que a temperatura não varie além de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ daquela ajustada. O tamanho deve ser suficiente para permitir um espaço maior que 2,5 cm entre as camadas adjacentes das placas, e destas à parede interna do incubador.

- Incubador refrigerado

É necessário para operar a temperatura de incubação de 25°C . As mesmas características acima (item F) devem ser observadas para o presente caso.

- Lupa ou microscópio, estereoscópio, Micronal ou Bausch & Lomb.

- Contador de colônias

O aparelho padrão é o contador quebec de campo escuro. Qualquer outro aparelho de eficiência equivalente é aceitável.

- Contador manual

É útil como auxiliar na contagem de colônias e determinação de viabilidade celular.

- Banho de água termostatzado

É necessário para manter o meio derretido entre 44 a 46°C .

- Pipeta de transferência

As pipetas sorológicas usadas para a transferência de suspensão bacteriana devem ter paredes retas, pontas polidas ou acabadas a fogo. Evite uso de pipetas com pontas danificadas.

Para calibração verifique as seguintes tolerâncias:

Capacidade	Tolerância	Tempo de esgotamento
1 ml	0,025 ml	2 a 3s
2 ml	0,025 ml	2 a 3s
10 ml	0,2 ml	3 a 4s

- Porta-pipetas

Construídas de metal não oxidável, cilíndrica ou paralelepípedica, de comprimento suficiente para permitir a acomodação fácil das pipetas.

- Tubos de diluição

Tubos de 16 mm de diâmetro de 150 mm de largura (capacidade aprox. 30 ml) com tampa de plástico autoclave e assento de borracha especial, ou outro material equivalente para impedir o vazamento.

- Tubos de Durham para fermentação (5 x 30 mm)

- Porta-tubos

Construído em arame galvanizado ou revestido por plástico para 32 ou 34 tubos de diâmetro de 18 mm.

- Placas de petri

Base de diâmetro superior a 87 mm e profundidade de 12 mm, com superfície plana e sem bolhas, riscos ou defeitos.

- Porta-placas

Construído de material não oxidável para protegê-las no intervalo entre as esterilizações.

- Dispositivo de filtração a vácuo

Dispositivo de membrana filtrante bacteriológica de porosidade inferior a 0,45 µm acoplado à bomba de vácuo de palheta para 400 a 600 mm de mercúrio.

- Outras vidrarias e utensílios

- Balão volumétrico, cap. 100, 200, 500 e 1.000 ml •
- Frasco erlenmeyer, cap. 250, 500 e 1.000 ml
- Copos beaker, cap. 150, 600 e 1.000 ml
- Provetas, cap. 100, 250, 500 e 1.000 ml
- Bico de gás tipo fischer
- Tripés e tela com amianto
- Frasco de Kitassato
- Termômetro de mercúrio
- Bureta de capacidade de 25 e 50 ml
- Porta bureta
- Tesoura, faca, espátula, pinça, alça de platina e outros pequenos utensílios •
- Algodão hidrófobo

6.2.2 Reagentes e meios de cultura

A - Agar de batata e glicose (PDA) (para contagem de leveduras e mofo)

Composição

- Infusão de batatas - 4,0 g
- D (+) - glicose - 20,0 g

- Agar - 15,0 g
- Água destilada - 1.000 ml

pH final deve ser de $5,6 \pm 0,1$ a 21°C

Antes do uso deve-se adicionar solução de ácido tartárico, controlando o pH através de fita indicadora, até $3,5 \pm 0,1$. O ácido é usado para inibir bactérias.

B - Solução de ácido tartárico

- Ácido tartárico - 5,0 g
- Glicose - 50,0 g
- Água destilada - 45,0 ml

C - Meio de melaço/sacarose sólido (MSS) (para contagem total)

- Melaço - 50,0 g
- Sacarose (açúcar branco) - 75,0 g
- Peptona - 1,0 g
- Extrato de levedura - 1,0 g
- K_2HPO_4 - 1,0 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{S}_4$ - 1,0 g
- Agar - 15,0 g
- Água destilada - 1.000 ml

pH final deve ser de $6,8 \pm 0,1$ a 21°C

Deve-se adicionar (100 ppm) de actidione ao meio, ou seja, prepara-se uma solução de 0,1g de actidione + 9,9 ml de água destilada estéril, de onde transfere-se 1 ml para cada 100 ml de meio derretido e resfriado a 45°C , pouco antes de colocar nas placas.

O actidione é utilizado como inibidor de leveduras.

D - Meio de melaço / sacarose sólido (MSS) + CaCO_3 (para contagem de bactérias produtoras de ácido)

Deve-se adicionar 100 ppm de actidione e 10,0 ml de solução de CaCO_3 10% para cada 90,0 ml de meio.

O CaCO_3 é solubilizado pelo ácido produzido pela bactéria, formando-se um halo claro em torno da mesma.

E - Meio TBY (para bactérias produtoras de goma)

Composição

- Triptona - 10,0 g
- Extrato de levedura - 5,0 g
- Sacarose - 100,0 g
- Glicose - 10,0 g
- Agar - 12,0 g
- Água destilada - 1.000 ml

pH final deve ser de $5,5 \pm 0,1$ a 21°C

Deve-se adicionar 100 ppm de actidione e 0,5 ml de solução de azida sódica 1% para cada 100 ml de meio.

A azida sódica é utilizada para inibir bactérias gram negativas.

F - Meio lactobacilli MRS agar (para bactérias lácticas ou bactérias totais)

Preparo agregando 1,5% de agar-agar no lactobacilli MRS Broth com a seguinte composição:

- Proteose peptona nº 3 - 10,0 g
- Extrato de carne bovina - 10,0 g
- Extrato de levedura - 5,0 g
- Glicose - 20,0 g
- Tween 80 - 1,0 g
- Citrato de amônio - 2,0 g
- Acetato de sódio - 5,0 g
- Sulfato de magnésio - 0,1 g
- Sulfato de manganês - 0,05 g
- Fosfato dissódico - 2,0 g
- Água destilada - 1.000 ml

O pH final após a esterilização deve ser 6,5 a 25°C

Deve-se agregar 100 mg/l de actidiona no meio derretido e resfriado a 45°C , pouco antes da colocação nas placas.

6.2.3 Preparo e esterilização de material e meios de cultura

- Esterilização por ar quente

Todo material seco, exceto material contendo plástico (placas de petri, pipetas, espátulas), pode ser esterilizado em estufa à temperatura de 170°C . Antes de colocar em estufa, esse material deve ser protegido contra a recontaminação utilizando-se porta-pipetas, porta-placas, papel de embrulho ou outro mecanismo protetor. Para assegurar a completa esterilização deve-se deixar pelo menos 2 horas na temperatura de 170°C .

- Esterilização por vapor

Os meios de cultivo, a água de diluição e outros líquidos estáveis ao calor devem ser esterilizados na autoclave a 121°C (1 Atm.) por 15 minutos no mínimo. Para preparo dos meios de cultivo os ingredientes são adicionados à água destilada e aquecidos à temperatura de ebulição em bico de gás, agitando-se frequentemente. Após a completa solubilização, restitui-se o volume evaporado e distribui-se em recipientes apropriados (frascos erlenmeyer de 250 ou 500 ml), em quantidades nunca superiores a 150 ml cada. Fecha-se com tampão de algodão e cobre-se com papel de embrulho antes de esterilizar na autoclave.

Se os meios forem usados imediatamente após a esterilização, colocam-se no banho a $44 - 46^{\circ}\text{C}$ até obter temperatura de equilíbrio. Se necessitar de armazenamento dos meios por um período maior que 3 ou 4 horas, estes devem ser esfriados e conservados em lugar fresco, preferivelmente

na geladeira. Antes do uso devem ser aquecidos em banho-maria até completa liquefação, e em seguida resfriados a 44 - 46°C no banho termostatzado.

Para esterilização da água de diluição, faz-se a distribuição de 9,3 ml do tampão diluído em cada um dos tubos (16 x 150 mm), e as tampas plásticas são colocadas frouxamente para permitir a expulsão de ar durante a autoclavagem. Logo após a esterilização e resfriamento aperte as tampas firmemente para evitar a evaporação e recontaminação.

- Esterilização por filtração

Os antibióticos actidione são instáveis a altas temperaturas. A esterilização é conduzida por filtração em filtro de membrana de porosidade 0,45 ou menos. O funil, o filtro, o frasco de Kitassato, e o tubo para recolhimento do filtrado devem ser previamente esterilizados por autoclavagem.

6.2.4 Diluição das amostras

Antes de iniciar a tarefa de diluição agite bem os frascos das amostras especialmente as de leite, pé-de-cuba e das dornas em fermentação, para que se tenha uma perfeita homogeneização. Cuidado especial deve ser tomado para aquelas com leveduras ativas por causa do aumento da pressão interna por agitação. Nestes casos deve-se intercalar a agitação com afrouxamento da tampa para aliviar a pressão.

A transferência da amostra para tubos de diluição é feita com pipeta de 1 ml tomando os devidos cuidados de assepsia. Algumas amostras, como leite e pé-de-cuba, podem apresentar dificuldade na transferência, devido à evolução de gás e viscosidade. Nestes casos, deve-se pipetar ou pesar 1g da amostra e transferir para o tubo de diluição. Para facilitar essa pesagem assepticamente, recomendase pesar o tubo com água de diluição, e agregar quantidade suficiente da amostra sem retirar o tubo da balança semi-analítica o que facilita sobremaneira essa operação.

Após a colocação das amostras, os tubos devem ser agitados vigorosamente para obter completa homogeneização. A diluição decimal maior é preparada transferindo-se 1 ml dessa amostra diluída em um outro tubo de diluição, agitando-se em seguida.

Repetindo-se a operação tem-se nova diluição, e assim sucessivamente. O número de diluições necessário vai depender da concentração de microrganismos presentes na amostra. (Figura 6.2.1)

Numa diluição adequada obtém-se, após plaqueamento, entre 30 e 300 colônias por placa.

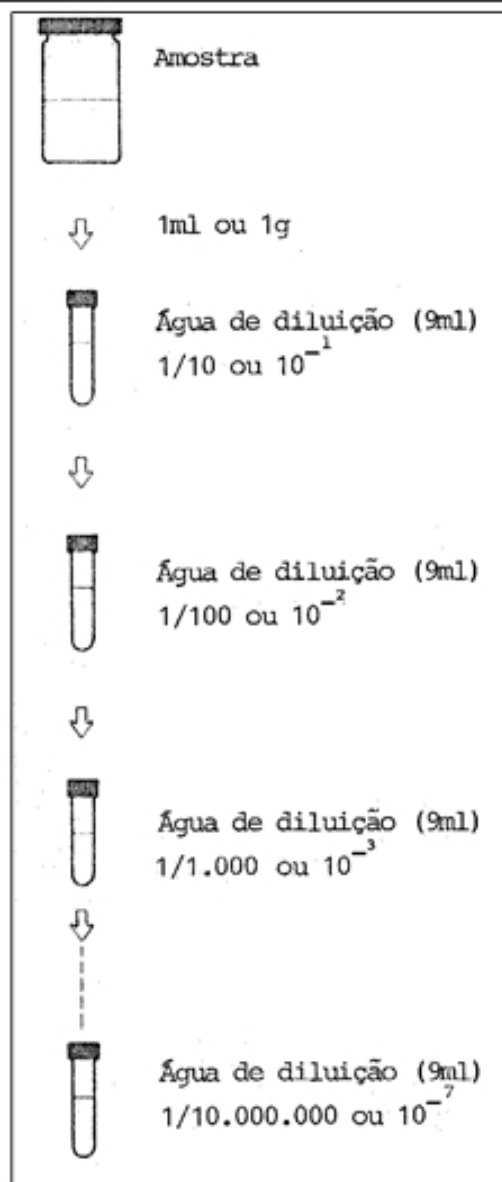


Figura 6.2.1 - Diluição das Amostras

6.2.5 Inoculação

6.2.5.1 Plaqueamento e contagem de colônias

- Liquefação do meio

Derrete-se a quantidade necessária do meio (específico para cada determinação) rapidamente no banho-maria, evitando a exposição prolongada à temperatura alta desnecessária, durante e após a liquefação. Se o meio for derretido em dois ou mais lotes, use totalmente o meio de cada lote na ordem de liquefação, desde que o conteúdo dos outros recipientes permaneça constantemente derretido.

O meio que foi mantido líquido por mais de três horas deve ser eliminado. A reestertilização do meio pode causar precipitação parcial dos ingredientes e deve ser evitada.

Resfrie o meio derretido imediatamente a 45°C e mantenha à temperatura de 44 - 46°C no banho termostatzado até o uso. Coloca-se o termômetro em um outro recipiente similar ao usado para o meio e expõe-se às mesmas condições no meio a fim de estabelecer o controle de temperatura.

- Colocação e agitação do agar

Selecione as amostras a serem semeadas em placas em uma série, de modo que o tempo decorrido entre a diluição da primeira amostra e a colocação da última placa da série seja menos de 20 minutos. (Quando necessitar de semeadura contínua por meio de um grupo de operadores, deve-se planejar o trabalho de modo que o tempo entre a colocação da amostra no primeiro diluente; ou diretamente em placa, e a colocação na última placa daquela amostra não seja superior a 20 minutos). Introduz-se 12 a 15 ml do meio derretido e resfriado a 44 - 46°C em cada placa levantando-se cuidadosamente a tampa da placa de petri o suficiente para a introdução da pipeta ou colocação do meio. Cuidadosamente evite o espalhamento do meio para fora da placa ou na parte interna da tampa. Logo após a colocação do meio nas placas, misture bem o meio com a amostra na placa (tomando-se cuidado para não borrifar o conteúdo nas paredes) por meio de rotação do mesmo, primeiro em um sentido e em seguida em sentido contrário, ou por meio de rotação e inclinação das placas ou pelo uso de agitador mecânico adequado. Tendo assim distribuído a mistura uniformemente na base da placa, deixe o meio se solidificar (dentro de 5 a 10 minutos) numa superfície plana. Após a solidificação as placas são invertidas e colocadas prontamente no incubador.

- Incubação

Incube as placas a 32°C ± 1°C por 48 horas, 3 horas para a contagem de bactérias totais e contagem de bactérias produtoras de ácido.

A temperatura do ar é um índice pouco confiável da temperatura do agar. Portanto, o bulbo do termômetro deve ser inserido em um frasco pequeno e bem fechado, e envolvido completamente por água ou outro líquido. Como a temperatura nas proximidades do topo do incubador é geralmente incorreta em relação ao restante da câmara, deve-se usar dois ou mais termômetros. Coloque um na estante superior e um na estante inferior, e outros termômetros nos pontos intermediários onde as placas são incubadas.

Registre as leituras de temperatura (pela manhã e no final do expediente) em áreas usadas para incubação de placas, especialmente quando tais temperaturas possam variar.

Evite o excesso de umidade no incubador para reduzir a tendência de formar colônias espalhadas. A secagem excessiva também deve ser evitada recirculando parte do ar para manter a umidade relativa controlada. As placas de agar não devem perder o peso de mais de 15% durante 48 horas de incubação.

Para contagem de fungos e leveduras as placas devem ser incubadas a 25°C ± 1°C por período de 3 a 5 dias. No geral, as contagens são bastantes próximas de modo que para análise de rotina pode-se usar apenas às contagens após 3 dias de incubação. O meio usado para essa contagem é o meio PDA acrescido de 1% de solução de ácido tartárico.

- Controle de esterilização de vidraria, meios e diluições

Certifique-se da esterilidade da água de diluição e meio, semeando as placas controle para cada lote esterilizado. As placas controle devem ser feitas para cada série de amostra, se o período entre as séries for muito grande. Como o número de amostras de uma série pode variar consideravelmente, essa recomendação é aplicada para um mínimo de uma placa controle, para amostras da manhã e

outra, para amostras da tarde. Se houver formação de colônias nas placas controle, testa-se também a contaminação do meio, da água de diluição, das placas ou pipetas e do ar.

A limpeza de área de plaqueamento com toalha umedecida em água ou solução diluída de desinfetante, antes do uso, embora não seja indispensável, é uma boa prática.

- Dispositivos auxiliares na contagem de colônias

Conte as colônias com auxílio de lente de aumento, sob iluminação uniforme e adequadamente controlada. Rotineiramente, use o contador de colônias tipo quebec, de preferência o modelo de campo escuro, equipado com uma placa guia quadriculada em 1 cm², ou outros dispositivos que ofereçam condições equivalentes de iluminação. Conte o total de colônias usando o contador manual. Evite o erro de contar as partículas insolúveis do meio ou material precipitado na placa com colônias puntiformes.

Examine os objetivos duvidosos cuidadosamente, usando aumentos maiores quando desejado, para distinguir as colônias e outros materiais estranhos (lupa ou microscópio estereoscópio).

- Seleção e contagem de placas

Conte todas as colônias das placas selecionadas após a incubação. Se for impossível contar prontamente, armazene as placas (após o período de incubação necessário) à temperatura de aproximadamente 5°C por um período nunca superior a 24 horas, mas evite isso na prática rotineira. Quando contar colônias nas placas de amostras individuais, observe as recomendações abaixo. Também registre no relatório de cada lote os resultados do teste de esterilização dos materiais (água de diluição, meio de cultivo e placas) feitos na ocasião do plaqueamento. Anote estes eventos para o grupo de placas, como descrito acima.

I) Uma placa com 30 a 300 colônias

Selecione as placas sem espalhamento com 30 a 300 colônias. Conte todas as colônias, incluindo aquelas puniformes, registre a diluição usada, e relate o número de colônias.

II) Placas em duplicata

(1) Se mais de uma placa de uma certa diluição for preparada, mas somente uma placa contém 30 a 300 colônias, conte também a outra placa duplicata, a não ser que seja excluída pelos itens (IV) e (VII) e considere a média aritmética. (2) Quando uma ou mais placas repetidas de diluições decimais consecutivas forem contadas, determinase a contagem média das diluições antes de proceder como no item (III).

III) Diluições consecutivas (30 a 300 colônias)

Se as placas de duas diluições decimais consecutivas tiverem 30 a 300 colônias cada, calcule a contagem por ml para cada diluição e multiplique as colônias das placas de diluição usada e registre a média aritmética como a contagem por ml, a não ser que a diferença entre os valores calculados seja maior que as duas vezes. Nesse último caso use a contagem inferior como contagem de placas por ml.

IV) Espalhamento

Se aparecerem colônias espalhadas na placa selecionada, somente conte as colônias das porções representativas da mesma quando: (1) há colônias bem distribuídas na área sem o espalhamento e (2) a área coberta por colônias espalhadas, incluindo a área prejudicada por causa dessas colônias, é inferior à metade da placa. Quando a área prejudicada exceder a um quarto do total da área, registra-se o teste como descrito no item (VII).

V) Sem placas com 30 a 300 colônias

Se não tiver placas com 30 a 300 colônias e uma ou mais placas com mais de 300 colônias, use a placa contendo o número mais próximo de 300 colônias, conte e avalie o número de colônias por placa como indicado no item (III).

VI) Todas as placas com menos de 30 colônias

Se as placas de todas as diluições tiverem menos de 30 colônias cada, registre o número real de colônias de menor diluição (a não ser que seja excluído pelos itens (IV) e (VII), mas registre o resultado da contagem como "menos de 30", multiplicando pela diluição correspondente. Por exemplo, se a diluição 1:100 for usada, e se o resultado da contagem for inferior a 30, registre: "< 3.000/ml".

VII) Acidentes de laboratório, inibidores de crescimento de bactérias, etc.

Se todas as placas de uma determinada amostra: (1) mostrarem ausência de colônias; (2) tiverem excesso de colônias espalhadas; (3) apresentarem contaminação ou (4) não forem satisfatórias, relate da seguinte forma: "sem colônias" (SC); "espalhamento" (Esp.); "acidente de laboratório", (AL) ou "inibidores de crescimento" (IC). Nas placas que não houver crescimento ou que mostrar proporcionalmente menos crescimento em diluições menores, o analista deverá suspeitar da presença de materiais inibidores na amostra examinada, mas tais resultados não devem ser interpretados como evidência da presença de inibidores. A presença de inibidores deve ser determinada por um teste apropriado designado especialmente para detectar tais agentes.

VIII) Cálculo e apresentação dos resultados

Para calcular a contagem por ml, multiplica-se o total de colônias, ou a média, ou o número avaliado pela recíproca da diluição usada. Quando apresentar os resultados, não use mais que os dois primeiros dígitos.

- Contagem de colônias espalhadas

Quando a contagem de colônias espalhadas for inevitável conte cada um dos 3 tipos distintos como uma colônia. O primeiro é a cadeia de colônias, não distintamente separadas, que parece resultar da desintegração de um aglomerado de bactérias quando a placa é agitada para misturar o agar com água de diluição. Se houver apenas uma dessas cadeias, conta-se como uma única colônia. Se uma ou mais cadeias parecem ser oriundas de fontes separadas conte cada fonte como uma colônia. Não conte cada ponto dessas cadeias como colônias separadas.

O segundo tipo é o espalhamento que se desenvolve no filme de água entre o agar e o fundo da placa. O terceiro tipo é aquele que forma no filme da água, nos cantos sobre a superfície de agar.

Os dois últimos tipos aparecem por causa do acúmulo de umidade no ponto onde se origina o espalhamento. Quando a água de diluição for inferiormente distribuída, a bactéria raramente forma colônias espalhadas. Qualquer laboratório com 5% das placas com mais de 1/4 coberto por colônias espalhadas deve tomar providência imediata para eliminar esse problema. Quando o espalhamento cobrir mais da metade da placa considerar para registros dos resultados como acidentes de laboratório.

- Erros pessoais

Evite a contagem imprecisa resultante do descuido, visão deficiente, ou falha no reconhecimento das colônias. Os técnicos de laboratório que não possam duplicar os seus próprios resultados de uma determinada placa dentro de 5% e a contagem de outro analista dentro de 10% devem descobrir a causa e corrigir tais defeitos.

6.2.6 Interpretação dos resultados

Para facilitar a análise dos resultados de contagem microbiana é conveniente dividir a análise em dois setores: (1) setor da extração e tratamento de caldo e (2) setor de fermentação e destilação.

6.2.6.1 Setor de extração de caldo

Os microrganismos de importância nesse setor são essencialmente aqueles oriundos do solo e vegetais. Dentre esses, os fungos, as leveduras e as bactérias lácticas e esporogêneas desempenham papel de importância em um ou mais pontos da usina. No processo utilizado no Brasil (extração mecânica) as bactérias esporogêneas têm uma importância relativa, mas as bactérias são extremamente importantes. Os fungos e leveduras também desempenham papel de relativa importância na fabricação do açúcar. As bactérias do ácido acético (*acetobacter*) têm alguma importância no setor de moendas e das peneiras removedoras de bagacilho.

O número de microrganismos presentes nas amostras de caldo, mosto, leite e outro material na usina varia em torno de alguns milhões a bilhões de indivíduos por mililitro ou por grama do produto.

Os resultados das contagens variam muito, de acordo com as condições da matéria-prima, dos equipamentos e processos utilizados na usina. Assim sendo, os limites toleráveis só serão perfeitamente válidos se forem estabelecidos para cada caso particular.

6.2.6.2 Setor de fermentação e destilação

Neste setor os microrganismos de importância são essencialmente (1) as leveduras que são as promotoras de fermentação alcoólica e (2) as bactérias lácticas que são as principais promotoras de fermentação indesejável.

Os métodos do tratamento do pé-de-cuba, da higienização das dornas e do preparo do mosto visam reduzir a incidência de bactérias lácticas e promover a atividade das leveduras.

A concentração de leveduras vivas nas diferentes etapas de fermentação varia de acordo com a adequação às condições de fermentação. Também, a concentração de bactérias lácticas varia consideravelmente de acordo com o grau de infecção.

7 Controle Microbiológico de Águas

7.1 Aparelhos e utensílios: idem 6.2.1

7.2 Reagentes e meios de cultura:

A) Lauryl sulfato triptose (para coliformes totais)

Peptona de caseira	: 20,0 g
Lactose	: 5,0 g
Cloreto de sódio	: 5,0 g
Fosfato de potássio monobásico	: 2,75 g
Lauryl sulfato de sódio - 0,1 g	
Água destilada	- 1.000 ml pH final: $6,8 \pm 0,2$

B) Caldo de lactose verde brilhante 2% (para coliformes totais)

Peptona	: 10,0 g
Lactose	: 10,0 g
Bile bovina	: 20,0 g
Verde brilhante	: 0,0133 g
Água destilada	: 1.000 ml
pH final = $7,2 \pm 0,2$	

C) Caldo EC (para coliformes fecais)

Lactose	: 5,0 g
Triptose	: 20,0 g
Sais biliares no 3	: 1,9 g
Fosfato de potássio dibásico anidro	: 4,0 g
Fosfato de potássio monobásico	: 1,5 g
Cloreto de sódio	: 5,0 g
Água destilada	: 1.000 ml
pH final = $6,9 \pm 0,2$	

D) Agar eosina azul de metileno (segundo Lewine) (para coliformes fecais)

Peptona	: 10,0 g
Lactose	: 10,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro	: 2,0 g
Eosina Y	: 0,4 g
Azul de metileno	: 0,065 g
Agar	: 15,0 g
Água destilada	: 1.000 ml
pH final = $7,1 \pm 0,1$	

E) Meio agar padrão (PCA) - para contagem total

Caseína digerida com suco pancreático	: 5,0 g
Extrato de levedura	: 2,5 g
Glicose	: 1,0 g
Agar-agar	: 15,0 g
Água destilada	: 1.000 ml

pH final deve ser $7,0 \pm 0,1$ a 25°C após esterilização

Obs.: Os meios A, B, C devem ser colocados em tubos de ensaio com 10 ml cada contendo tubo de Durham para verificar formação de gás. O meio Agar eosina após esterilização deve ser colocado em placas com 20 ml cada e deixado solidificar para posterior inoculação com alça de platina.

O meio E deve ser esterilizado e resfriado a 46°C para semeadura de profundidade.

7.3 Esterilização idem 6.2.3

7.4 Diluição das amostras idem 6.2.4

7.5 Inoculação

7.5.1 Plaqueamento idem 6.2.5.1

7.5.2 NMP (número mais provável)

7.5.2.1 Determinação de coliformes totais

A) Prova presuntiva

- Numa série de 9 tubos de caldo lauril sulfato triptose concentração simples, inocular 3 tubos 1,0 ml, 3 tubos com 0,1 ml e 3 tubos com 0,01 ml.
- Homogeneizar e incubar a $(35 \pm 0,50)^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- Após incubação, observar todos os tubos quanto a produção de gás, seja nos tubos de durhan ou pelo desprendimento de gás produzido quando os tubos são agitados.
- Encaminhar imediatamente os tubos positivos para provas confirmatórias.
- Reincubar os tubos negativos por mais 24 horas e ao cabo deste tempo novamente observar quanto a formação de gás.
- Submeter também os tubos positivos após 48 horas de incubação a provas confirmatórias.

B) Prova confirmatória

- Transferir uma alçada dos tubos positivos de caldo lauril sulfato triptose para tubos de caldo lactose verde brilhante bile 2%.
- Incubar os tubos inoculados, por 48 horas a $(35 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$.
- Decorrido o tempo de incubação, a formação de gás indica prova positiva para bactérias coliformes totais.
- Contar os tubos positivos em cada diluição e com a combinação de números resultante obter o NMP de coliformes totais por grama ou ml de amostra com o auxílio da tabela anexa (Tabela 7.5.1).

Tabela 7.5.1 - Número mais Provável

Número mais provável de intervalo de confiança a 95% para várias combinações de resultados positivos, quando três tubos são usados por diluição (1,0, 0,1 e 0,01g).

Número de Tubos Positivos por g de Amostras							
1,0 g	0,1 g	0,01 g	NMP	1,0 g	0,1 g	0,01 g	NMP
0	0	0	< 0,3	2	0	0	0,9
0	0	1	0,3	2	0	1	1,4
0	0	2	0,6	2	0	2	2,0

Número de Tubos Positivos por g de Amostras							
1,0 g	0,1 g	0,01 g	NMP	1,0 g	0,1 g	0,01 g	NMP
0	0	3	0,9	2	0	3	2,6
0	1	0	0,3	2	1	0	1,5
0	1	2	0,92	2	1	2	2,7
0	1	3	1,2	2	1	3	3,4
0	2	0	0,62	2	2	0	2,1
0	2	1	0,93	2	2	1	2,8
0	2	2	1,2	2	2	2	3,5
0	2	3	1,6	2	2	3	4,2
0	3	0	0,94	2	3	0	2,9
0	3	1	1,3	2	3	1	3,6
0	3	2	1,6	2	3	2	4,4
0	3	3	1,9	2	3	3	5,3
1	0	0	0,36	3	0	0	2,3
1	0	1	0,72	3	0	1	3,9
1	0	2	1,1	3	0	2	6,4
1	0	3	1,5	3	0	3	9,5
1	1	0	0,73	3	1	0	4,3
1	1	1	1,1	3	1	1	7,5
1	1	2	1,5	3	1	2	12
1	1	3	1,9	3	1	3	16
1	2	0	1,1	3	2	0	9,3
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	2	2	2,0	3	2	2	21
1	2	3	2,4	3	2	3	29
1	3	0	1,6	3	3	0	24
1	3	1	2,0	3	3	1	46
1	3	2	2,4	3	3	2	110
1	3	3	2,9	3	3	3	> 240

7.5.2.2 Coliformes fecais

- A partir dos tubos positivos de caldo lauril sulfato triptose, transferir uma alçada para tubos contendo caldo E.C.
- Incubar os tubos em banho-maria a $(44,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas $\pm$ 2 horas num prazo não superior a 30 minutos após a semeadura.
- A formação de gás nos tubos de caldo E.C. inoculados indica prova positiva para bactérias coliformes fecais.
- Contar os tubos positivos em cada diluição e com a combinação de números resultante obter o número mais provável de coliformes fecais por grama ou ml de amostra com o auxílio da tabela anexa.
- Transferir, com alça de platina ou níquel-cromo, uma porção de cada tubo positivo de caldo E.C. Para placas com agar eosina azul de metileno segundo Levine.
- Incubar as placas invertidas em estufa a $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- Decorrido o tempo de incubação verificar a presença de colônias de 1 mm a 3 mm de diâmetro, centro escuro e brilho metálico verde.

8 Análises Microscópicas

8.1 Viabilidade

O método proposto é uma modificação daquele tradicionalmente utilizado, uma vez que padroniza a concentração de corante, o pH, o meio e o tempo de "tingimento" das células e leveduras, visando melhorar o controle da fermentação.

- Pontos de moagem

Devem ser amostrados os seguintes pontos:

- Dornas no final de fermentação (dorna morta);
- Pé-de-cuba;
- Leite de levedura.

- Método de amostragem

As amostras devem ser coletadas em frascos limpos e secos, mergulhando estes diretamente com as mãos. Deve-se evitar a análise após 1 hora da coleta.

- Material:

- Tubos de ensaio de 25 ml;
- Pipetas graduadas, cap. 10 ml;
- Pipeta graduada, cap. 1 ml;
- Balão volumétrico, cap. 1.000 ml;
- Pipeta de Pasteur;
- Becker, cap. 50 e 250 ml;
- Suporte para tubo de ensaio;
- Câmara de Neubauer;
- Microscópio.

- Reagentes:

Para 1.000 ml de solução pesar:

- | | |
|---|--------|
| • Azul de metileno | 0,25 g |
| • NaCl | 9,0 g |
| • KCl | 0,42 g |
| • $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,48 g |
| • NaHCO_3 | 0,2 g |
| • Glicose | 10 g |

Manter em agitação por 6 horas, filtrar em papel de filtro e armazenar.

- Técnica:

- Colocar em um tubo de ensaio limpo 0,5 ml da suspensão de levedura (vinho) e 9,5 ml da solução corante, para atingir um teor de fermento em torno de 0,5% (vol.).
- Fechar o tubo de ensaio e agitar intensamente por 30 segundos.

- Deixar o tubo no suporte por mais um minuto.
 - Preparar a câmara de Neubauer colocando a lamínula sobre o reticulado. Agitar novamente o tubo.
 - Com a pipeta de Pasteur transferir uma gota para a margem da lamínula. O excesso de líquido será drenado para periferia do reticulado.
- Colocar a lâmina sobre a platina do microscópio e observar com um aumento de 400 a 600x.
- Contar no mínimo 600 células em 2 montagens diferentes da câmara de Neubauer, contando células no reticulado superior e inferior.
- Anotar o número de células por quadrado seguindo o boletim anexo.

Exemplo:

• Número total de células contadas	: 316
• Número de células não coradas	: 298
• Número de brotos não corados	: 101
• % células viáveis	: 94,3
• % células mortas	: 5,2
• Brotamento	: 31,9%

Observações:

- Podemos utilizar como critério para distinguirmos uma célula de um broto o tamanho do broto, admitindo que um broto seja menor que a metade do tamanho da célula-mãe.
- Quanto à diluição da amostra, esta deve ser feita com a solução corante visando conseguir uma média de 40 - 100 células por campo, indiferente da origem da amostra (vinho, leite, pé-de-cuba, etc).
- Bactérias: Os bastonetes podem ser contados simultaneamente às leveduras, porém com uma precisão menor.

Câmara de contagem Neubauer (Figura 8.2)

Uma câmara de contagem típica consiste de uma depressão central de superfície conhecida, permitindo determinar a concentração celular da amostra.

Assim, a câmara de contagem consiste de uma lâmina espessa de vidro, de forma retangular, atravessada transversalmente por 4 sulcos e um central (formando um H central) que delimitam 3 áreas de níveis diferentes. A plataforma central, que é dividida transversalmente por um sulco, possui uma área reticulada em cada lado e é exatamente 0,1 mm mais baixa que as duas plataformas laterais, onde se apoia a lamínula, deixando, portanto, um espaço com 0,1 mm de profundidade.

A câmara de contagem e a lamínula são polidas para garantir o bom contacto entre ambas e devem ser limpas com água, álcool ou sabão neutro e secas com papel para lentes (sem silicone).

A área reticulada consiste de 3 mm x 3 mm ou 9 mm². Esta área é dividida em 9 quadrados grandes de 1 mm de lado ou superfície 1 mm², sendo novamente subdivididos, os 8 externos em 16 quadrados médios de 0,25 mm de lado ou superfície 0,0625 mm² e o central, em 400 quadrádinhos de 0,05 mm de lado ou superfície 0,0025 mm².

No modelo moderno aqui descrito (Neubauer), há linhas separatórias que dividem o quadrado central em 5 grupos de quadrados médios, de 0,2 mm de lado ou superfície 0,04 mm². Estes quadrados médios subdividem-se, cada um, em 16 quadrádinhos de 0,0025 mm² de superfície cada, sendo os quadrados médios separados por linhas tríplexes, chegando-se assim, aos 400 quadrádinhos. Ver esquema na Figura 8.3.

A câmara é acompanhada de lamínulas planas especiais, que se adaptam perfeitamente sobre as plataformas laterais, deixando um espaço de 0,1 mm entre ela e a plataforma central. Portanto, cada um dos quadrádinhos possui um volume de 0,00025 mm³ e o total de 400 quadrádinhos de 0,1 mm³.

Para evitar contar as células duas vezes devemos usar como regra a contagem das células que estão sobre as linhas, apenas aquelas do lado esquerdo e no topo. Também para evitar parcialidade do operador na escolha dos quadrádinhos a contar devemos fixar como regra a contagem das células somente nos 4 quadrados dos cantos e no central do reticulado.

A Figura 8.1 mostra uma planilha de cálculo dos índices mais importantes que deve ser usada para tornar os critérios homogêneos. Observar que nesta planilha existe um "gabarito" para identificação dos objetos a serem contados.

LEGENDA:

- 1 VIVA
- 1 VIVA 1 BROTO
- 1 VIVA 1 BROTO 1 MORTO
- 2 VIVAS
- 1 MORTA
- 1 MORTA 1 BROTO
- 1 MORTA 1 BROTO 1 MORTO
- 2 MORTAS

TIPOS DE CONTAGEM:

- 1 VIVA 1 BROTO MÚLTIPLO
- FLOCO COM 12 CÉLULAS
- PSEUDOMICÉLIO COM 4 CÉLULAS
- BASTONETES

CÁLCULOS:

- VIABILIDADE = $\frac{\text{VIVAS (1)} + \text{MORTAS (2)}}{\text{VIVAS (1)} + \text{MORTAS (2)}} \times 100$
- BROTAMENTO = $\frac{\text{BROTOS (3)}}{\text{VIVAS (1)} + \text{MORTAS (2)}} \times 100$
- VIAB. BROTOS = $\frac{\text{BROTOS (3)}}{\text{BROTOS (3)} + \text{BR. MORTOS (4)}} \times 100$
- CONC. LEV. VIVAS = $\frac{\text{VIVAS (1)}}{(\text{N}^\circ/\text{ml AMOSTRA}) \times \text{N}^\circ \text{ DE } \square (5)} \times \text{DILUIÇÃO (6)} \times 2,5 \times 10^5$
- CONC. BASTONETES = $\frac{\text{BASTONETES (8)}}{(\text{N}^\circ/\text{ml AMOSTRA}) \times \text{N}^\circ \text{ DE } \square (5)} \times \text{DILUIÇÃO (6)} \times 2,5 \times 10^5$
- PSEUDOMICÉLIO P/ CAMPO = $\frac{\text{PSEUDOMICÉLIO (9)}}{\text{N}^\circ \text{ DE } \square (5)}$
- Nº DE LEVEDURA P/ PSEUDOMICÉLIO =
- FLOCOS POR CAMPO = $\frac{\text{FLOCO (7)}}{\text{N}^\circ \text{ DE } \square (5)}$
- Nº LEVEDURAS POR FLOCOS =
- Nº BROTOS MÚLTIPLOS P/ CAMPO = $\frac{\text{BROTOS MÚLTIPLOS (10)}}{\text{N}^\circ \text{ DE } \square (5)}$
- B = E =

CRITÉRIOS:

- A > 90%
- B > 25%
- C > 80%
- D = E > 10
- F = G = H = I = J = 0

Figura 8.1 - Planilha de Cálculo

8.2 Coloração de Gram

8.2.1 Introdução

O método de Gram se baseia no fato de que quando certas bactérias são coradas pelo cristal violeta e depois tratadas pelo iodo (lugol), forma-se um composto entre o corante e o iodo, o qual é tão

fortemente retido pela célula bacteriana que não é removido pelo tratamento subsequente com álcool: são as bactérias Gram positivas, que se coram de azul roxeadado. As bactérias Gram negativas se deixam descorar facilmente pelo álcool.

Portanto, se após o tratamento com álcool fizermos uma coloração de fundo com safranina, as bactérias Gram negativas aparecerão vermelhas. O mecanismo da coloração de Gram ainda é, até hoje, bastante discutido, mas sabe-se sem dúvida que está relacionado com as diferenças de permeabilidade da parede celular.

Nas bactérias Gram positivas a parede celular é constituída por uma camada espessa de mucopeptideo superposta à membrana citoplasmática. O complexo corante iodo adere a esta camada e não se deixa remover pelo álcool na técnica de Gram. Nas mesmas condições, as bactérias Gram negativas, que possuem uma camada muito mais fina de mucopeptideo protegida por duas camadas de lipolissacárides e lipoproteínas, se deixam descorar, pois o tratamento com álcool aumenta a permeabilidade das duas camadas externas, permitindo assim a remoção do corante da fina camada de mucopeptideo que o retinha.

8.2.2 Metodologia

8.2.2.1 Preparo de corantes

A) Solução A:

Cristal violeta - 2,0 g
Etanol 95% - 20,0 ml

Solução B:

Oxalato de amônio - 0,8 g
Água destilada - 80,0 ml

Misturar A e B. Estocar 24 horas antes de usar e filtrar com papel de filtro num frasco de estoque.

B) Misturar 1,0 g de iodo metálico com 2,0 g de iodeto de potássio e transferir para um Graal. Adicionar alguns ml de água e moer. Adicionar + água até completa dissolução (até 300 ml). Transferir a solução para um frasco âmbar.

C) Misturar álcool 95% + acetona na proporção 1:1.

D) A safranina pode ser preparada na concentração de 250 mg/100 ml. Primeiro faça uma solução de safranina (estoque) pesando 2,5 g de safranina e dissolvendo em 100 ml de etanol.

Para coloração, prepare previamente uma diluição tomando 10 ml da solução estoque e completando o volume a 100 ml com água destilada.

8.2.2.2 Procedimento

- Faça uma suspensão celular (não muito espessa) e faça um esfregaço na lâmina.
- Fixar no calor da chama do bico de busen (tomando cuidado para não aquecer demasiadamente). Esfriar.
- Cobrir o material com o corante cristal violeta (solução A + B) durante 1 minuto.

- Lavar em água corrente para retirar o excesso de corante.
- Cobrir o material com a mistura I 2 e KI (Lugol) durante 1 minuto.
- Lavar em água corrente e descolorir com a mistura álcool - acetona até retirar todo o excesso de corante, isto é, até que o solvente permaneça incolor.
- Lavar em água corrente.
- Cobrir com safranina por 10 segundos.
- Lavar em água, inclinar a lâmina para escorrer o excesso de água e deixar secar ao ar. Examine ao microscópio sob imersão.

Resultado:

- Organismos Gram positivos coram em azul;
- Organismos Gram negativos coram em vermelho.

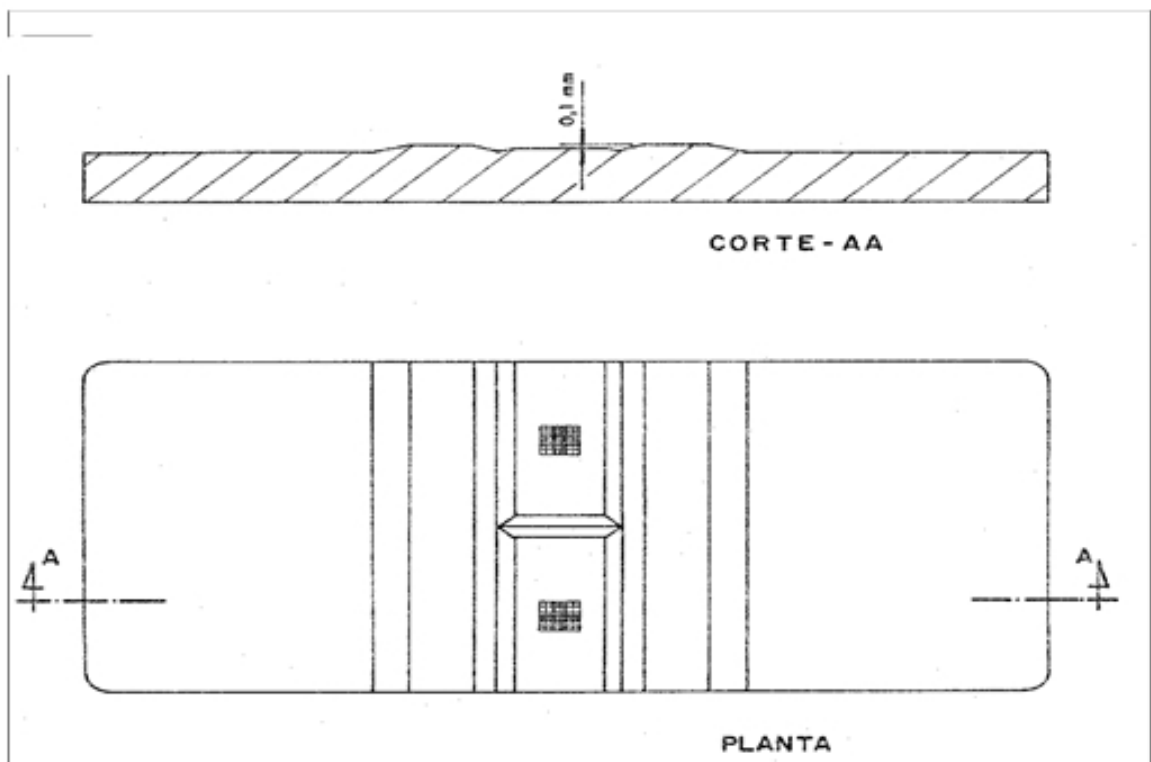


Figura 8.2 - Câmara de Neubauer

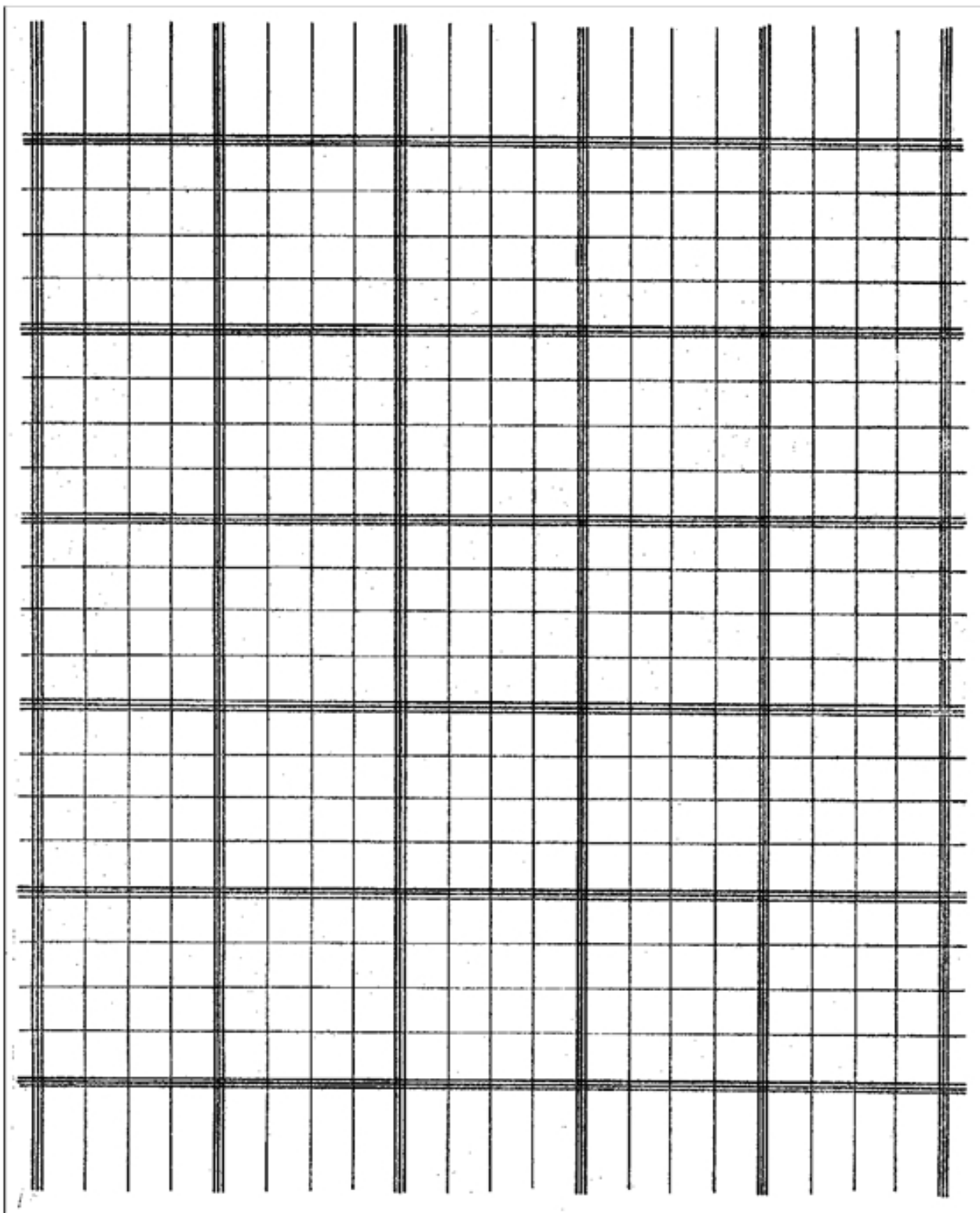


Figura 8.3 - Esquema da Câmara de Neubauer

9 Determinação de Δ pH e Δ Acidez

Material:

- Béquero de 250 ml
- Proveta de 100 ml
- Banho-maria
- Bureta
- pHmetro

Reagente:

- NaOH 1N
- H_3PO_4

Técnica:

- Transferir 100 ml da amostra para um béquer de 250 ml;
- Ajustar o pH a 5,5 e determinar a acidez sulfúrica;
- Incubar a $37,0 \pm 0,5$ °C por 4 horas, no banho-maria;
- Determinar o pH e acidez sulfúrica (descrito no Manual de Controle Químico da Fermentação);
- Calcular o pH a acidez (inicial - final).

Resultado:

O aumento da acidez ou queda de pH indica contaminação da amostra por microrganismos produtores de ácido. Dentre estes microrganismos estão as bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras.

Quanto maior for o pH ou acidez de uma amostra, maior será seu grau de contaminação.

10 Força Fermentativa

10.1 Introdução

A determinação da força fermentativa de uma amostra de leveduras é medida através da liberação de CO_2 da mesma em condições padronizadas.

Para esta determinação foi desenvolvido um equipamento que opera à pressão constante medindo o CO_2 , através de um volume de líquido deslocado durante um certo tempo de fermentação.

Por ser um método rápido e padronizado, nos permitirá, num curto espaço de tempo, fornecer dados que permitam modificações com relação a parâmetros que controlam, por exemplo, o tratamento ácido de leite de leveduras e o grau alcoólico durante a fermentação.

10.2 Materiais e métodos

10.2.1 Vidraria e equipamentos

Balões de destilação de fundo chato (1.000 ml); balões de 3 bocas (1.000 ml); rolhas de borracha; mangueiras de silicone ou látex; pinças de Mohr; funis de separação graduados (1.000 ml); varas de vidro; bombas manuais de borracha; braçadeiras; banho-maria com regulagem para 33° - 0,5°C tipo Dubnof (com agitação); suporte de madeira revestido de fórmica para acoplar o sistema.

10.2.2 Reagentes

Dicromato de potássio; solução de ácido sulfúrico 1N; sacarose ou açúcar cristal; extrato de levedura.

10.2.3 Preparo de suspensões para análise

- Suspensão padrão de amostra:
Suspender 5 g de amostra previamente centrifugada (leite de leveduras, pé-de-cuba, dorna) em 100 ml de água a 33°C.
- Mosto padrão:
Dissolver em 300 ml de água a 33°C 40 g de sacarose ou açúcar cristal e 2 g de extrato de levedura.
- Solução ácida de dicromato de potássio:
Pesar 1g de dicromato de potássio, juntar 10 ml de ácido sulfúrico e completar o volume para 1.000 ml com água destilada.

10.2.4 Procedimento

Em um banho-maria a 33°C colocar o frasco A que deverá conter o mosto padrão mais a suspensão de células (Figura 10.1).

No frasco B colocar a solução ácida de dicromato de potássio.

O sistema deve ser fechado e em seguida pressurizado através de uma bomba manual e passado o líquido por uma coluna de vidro C.

O volume de solução deslocado para o funil de separação D durante a determinação deve ser anotado de 10 em 10 minutos.

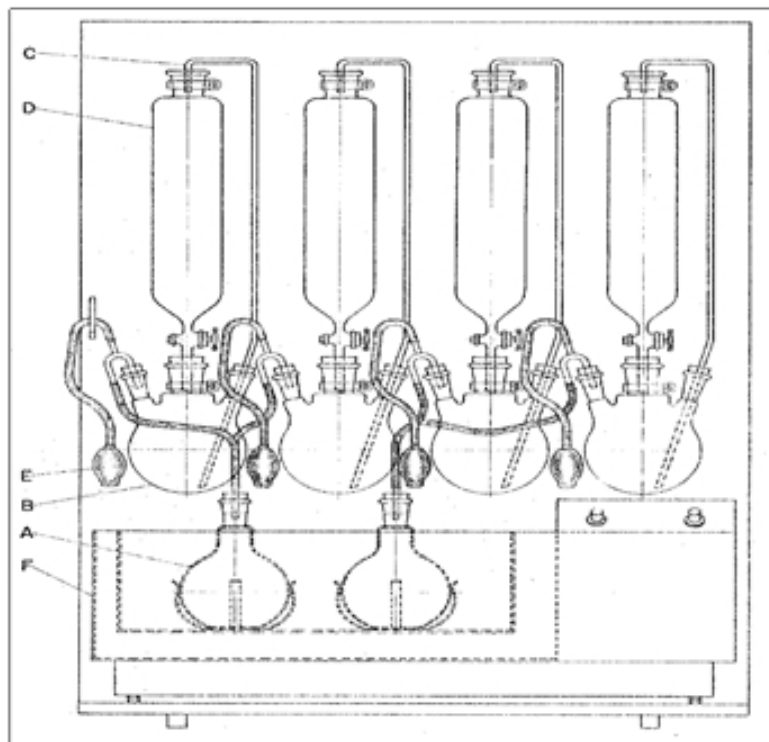


Figura 10.1 - Equipamento para Determinação da Força Fermentativa

10.3 Resultados

Aos valores de volume deslocado x tempo, plotados em gráfico, deverá ser ajustada uma reta (com $r = 0,99$), com intervalo de uma hora entre o 1º e o último ponto escolhido (Figura 10.2).

A força fermentativa será dada pela expressão:

$$FF = \frac{V_2 - V_1}{P}$$

P

Onde:

V_2 = Volume de líquido deslocado no final de uma determinada hora (escolhida no gráfico). V_1

= volume de líquido deslocado no início da mesma hora

P = massa da amostra

Exemplo:

Na Tabela 10.1 são mostrados os resultados de um teste realizado no LDI referente às curvas da Figura 10.2.

Tabela 10.1 - Força Fermentativa (FF) de Quatro Amostras de Leveduras (Reatores 1, 2, 3, 4)

Reator	Intervalo (min.)	r	V_1 (ml)	V_2 (ml)	Massa(g)	FF (ml CO_2 /g.h)
1	50' - 110'	0,9980	125	550	5	85
2	50' - 110'	0,9981	125	585	5	92
3	50' - 110'	0,9991	130	580	5	90
4	50' - 110'	0,9985	130	580	5	90

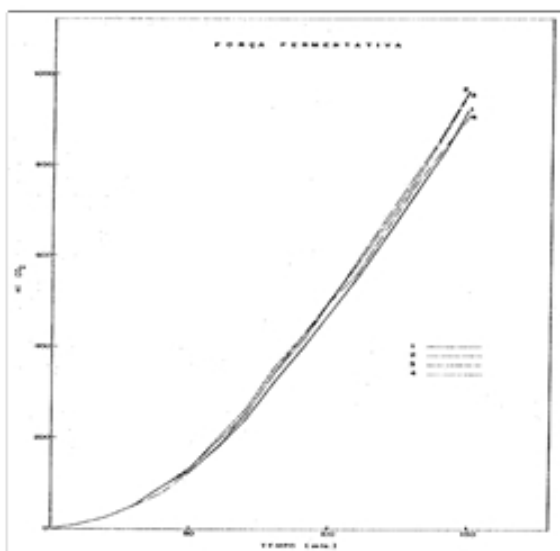


Figura 10.2 - Volume de CO_2 Deslocado x Tempo (Em Quatro Amostras de Leveduras)

SUSSMAN, A. S. Microorganismos: crescimento, nutrição e interação. EDART, 1970.

LEHNINGER, A. L. Bioquímica; tradução de J. R. Magalhães e outros. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. 4 v.

CARPENTER, P. C. Microbiology. 4. ed. W.B. Sanches, 1977.

MERCK. Manual de Microbiologia de Alimentos.

ABNT. Normas técnicas.

CADERNOS COPERSUCAR SÉRIE INDUSTRIAL, n. 5, mar. 1983.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA. Fermentação. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar / Divisão Industrial, 1987. 434 p. il.

BIER, O. Bacteriologia e imunologia.

AZEVEDO, João Lúcio de. Genética de microorganismos: em biotecnologia e engenharia genética. Piracicaba: FEALQ, 1985. 173 p.

LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter. Tecnologia das fermentações. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. 285 p. (Biotecnologia, 1).