



Microbiologia Aplicada

Darlene Ana de Paula Vieira

Nayara Cláudia de Assunção Queiroz Fernandes



Inhumas - GO
2012

Presidência da República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica

© Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Este caderno foi elaborado em parceria entre o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás/IFG-Inhumas e a Universidade Federal de Santa Maria para o Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil – Rede e-Tec Brasil.

Equipe de Elaboração – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás/IFG-Inhumas

Reitor

Paulo César Pereira/IFG-Inhumas

Diretor Geral

Cleiton José da Silva/IFG-Inhumas

Coordenação Institucional

Daniel Aldo Soares/IFG-Inhumas

Coordenador de Curso

Rodrigo Cândido Borges/IFG-Inhumas

Professor-autor

Darlene Ana de Paula Vieira/IFG-Inhumas

Nayara Cláudia de A. Queiroz Fernandes/IFG-Inhumas

Equipe Técnica

Renata Luiza da Costa/IFG-Inhumas

Shirley Carmem da Silva/IFG-Inhumas

Viviane Margarida Gomes/IFG-Inhumas

**Comissão de Acompanhamento e Validação
Colégio Técnico Industrial de Santa Maria/CTISM**

Coordenador Institucional

Paulo Roberto Colusso/CTISM

Coordenação Técnica

Iza Neuza Teixeira Bohrer/CTISM

Coordenação de Design

Erika Goellner/CTISM

Revisão Pedagógica

Andressa Rosemárie de Menezes Costa/CTISM

Francine Netto Martins Tadielo/CTISM

Marcia Migliore Freo/CTISM

Revisão Textual

Eduardo Lehnhart Vargas/CTISM

Lourdes Maria Grotto de Moura/CTISM

Vera Maria Oliveira/CTISM

Revisão Técnica

Josiane Pacheco Menezes/CTISM

Ilustração

Marcel Santos Jacques/CTISM

Rafael Cavalli Viapiana/CTISM

Ricardo Antunes Machado/CTISM

Diagramação

Gustavo Schwendler/CTISM

Leandro Felipe Aguilar Freitas/CTISM

Máuren Fernandes Massia/CTISM

Ficha catalográfica elaborada por Maria Aparecida Rodrigues de Souza
CRB 1/1497 – bibliotecária do IFG – Campus Inhumas

V658m Vieira, Darlene Ana de Paula
Microbiologia Aplicada / Darlene Ana de Paula Veira, Nayara Cláudia de Assunção Queiroz Fernandes. – Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012.
90 p. : il.
Bibliografia.

Caderno elaborado em parceria entre o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás/IFG-Inhumas e a Universidade Federal de Santa Maria para o Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil – e-Tec Brasil.

1. Microbiologia Aplicada. 2. Açúcar – Processo de Produção. 3. Álcool – Processo de Produção. 4. Fernandes, Nayara Cláudia de Assunção Queiroz. I. Título.

CDD 660.62

Apresentação e-Tec Brasil

Prezado estudante,

Bem-vindo ao e-Tec Brasil!

Você faz parte de uma rede nacional pública de ensino, a Escola Técnica Aberta do Brasil, instituída pelo Decreto nº 6.301, de 12 de dezembro 2007, com o objetivo de democratizar o acesso ao ensino técnico público, na modalidade a distância. O programa é resultado de uma parceria entre o Ministério da Educação, por meio das Secretarias de Educação a Distância (SEED) e de Educação Profissional e Tecnológica (SETEC), as universidades e escolas técnicas estaduais e federais.

A educação a distância no nosso país, de dimensões continentais e grande diversidade regional e cultural, longe de distanciar, aproxima as pessoas ao garantir acesso à educação de qualidade e ao promover o fortalecimento da formação de jovens moradores de regiões distantes dos grandes centros geograficamente ou economicamente.

O e-Tec Brasil leva os cursos técnicos a locais distantes das instituições de ensino e para a periferia das grandes cidades, incentivando os jovens a concluir o ensino médio. Os cursos são ofertados pelas instituições públicas de ensino, e o atendimento ao estudante é realizado em escolas-polo integrantes das redes públicas municipais e estaduais.

O Ministério da Educação, as instituições públicas de ensino técnico, seus servidores técnicos e professores acreditam que uma educação profissional qualificada – integradora do ensino médio e educação técnica, – é capaz de promover o cidadão com capacidades para produzir, mas também com autonomia diante das diferentes dimensões da realidade: cultural, social, familiar, esportiva, política e ética.

Nós acreditamos em você!

Desejamos sucesso na sua formação profissional!

Ministério da Educação
Janeiro de 2010

Nosso contato
etecbrasil@mec.gov.br



Indicação de ícones

Os ícones são elementos gráficos utilizados para ampliar as formas de linguagem e facilitar a organização e a leitura hipertextual.



Atenção: indica pontos de maior relevância no texto.



Saiba mais: oferece novas informações que enriquecem o assunto ou “curiosidades” e notícias recentes relacionadas ao tema estudado.



Glossário: indica a definição de um termo, palavra ou expressão utilizada no texto.



Mídias integradas: sempre que se desejar que os estudantes desenvolvam atividades empregando diferentes mídias: vídeos, filmes, jornais, ambiente AVEA e outras.



Atividades de aprendizagem: apresenta atividades em diferentes níveis de aprendizagem para que o estudante possa realizá-las e conferir o seu domínio do tema estudado.



Sumário

Palavra do professor-autor	9
Apresentação da disciplina	11
Projeto instrucional	13
Aula 1 – Técnicas básicas utilizadas em microbiologia	15
1.1 Normas de segurança e de conduta em laboratório	15
1.2 Materiais e equipamentos usados em laboratório de microbiologia	17
1.3 Técnicas de esterilização e desinfecção de materiais	20
Aula 2 – Importância da microbiologia no processo de produção	23
2.1 Microbiologia na indústria de açúcar e álcool	23
2.2 Etapas do processamento industrial da cana-de-açúcar	24
2.3 Análises rotineiras durante o processamento	27
Aula 3 – Microrganismos relevantes em processos industriais de produção de açúcar e álcool	31
3.1 Leveduras <i>Saccharomyces</i>	31
3.2 Microrganismos contaminantes	32
3.3 Antibióticos e bactericidas	35
Aula 4 – Meios de cultura	39
4.1 Classificação dos meios de cultura	39
4.2 Preparo de meios de cultivo	41
Aula 5 – Técnicas de coloração e de contagem microbiológica	47
5.1 Técnicas de coloração de microrganismos	47
5.2 Técnicas básicas de contagem microbiológica	49
Aula 6 – Métodos microbiológicos aplicados à produção de álcool	55
6.1 Leveduras	55
6.2 Bactérias	60
6.3 Dextrana em caldo	65
6.4 Delta pH	67

6.5 Acidez sulfúrica.....	67
6.6 Nível de floculação.....	67
6.7 Teste de sensibilidade de bactérias a antimicrobianos.....	68
Aula 7 – Microbiologia do açúcar.....	73
7.1 A importância da microbiologia do açúcar.....	73
7.2 Principais microrganismos relacionados ao processo de fabricação do açúcar.....	74
7.3 Análises microbiológicas.....	79
7.4 Padrões internacionais para o controle microbiológico do açúcar.....	85
Referências.....	87
Currículo do professor-autor.....	89

Palavra do professor-autor

Caro aluno!

O processo de ensinar e aprender na modalidade de ensino à distância apresenta suas próprias peculiaridades, pressupondo-se uma relação de reciprocidade, na qual o aluno deve participar de forma ativa e dinâmica. Este material de estudo representa, portanto, um canal de comunicação elaborado com a finalidade de auxiliar e apontar caminhos para que você, estudante, possa conduzir seus próprios estudos e construir novos conhecimentos.

Nele foram apresentadas informações básicas sobre Microbiologia Aplicada e as principais técnicas voltadas à produção de açúcar e álcool, visando fornecer subsídios para o seu aprendizado e atuação profissional.

Cabe à você, como protagonista na construção do seu próprio conhecimento, se empenhar na busca incessante e atualização das informações adquiridas, não se atendo somente ao conteúdo e atividades propostas, mas interagindo e ampliando as idéias e conceitos formados. Para isso, você poderá explorar as diferentes mídias propostas no ambiente virtual. Aproveite bem e bons estudos!

Um forte abraço.
As autoras.



Apresentação da disciplina

Este caderno de estudos foi elaborado com o intuito de fornecer a você, estudante, conceitos e técnicas importantes na área da Microbiologia Aplicada à produção de açúcar e álcool. Para tornar a exposição dos conteúdos mais clara e organizada, o material foi dividido em aulas, tratando inicialmente dos princípios básicos da microbiologia em laboratório e em seguida das técnicas específicas aplicadas à indústria sucroalcooleira, facilitando assim os seus estudos.

A aula 01 fornece noções e regras básicas de segurança em laboratório. Apresenta os principais materiais e equipamentos utilizados nesse ambiente de trabalho e as formas de limpeza e desinfecção.

Na aula 02 foram apresentadas, resumidamente, as principais etapas do processamento da cana-de-açúcar. Assim, o estudante poderá compreender como a microbiologia pode ser aplicada nos processos de produção de açúcar e álcool.

A aula 03 apresenta os microrganismos comuns ao processo fermentativo e os seus contaminantes. Nela também falamos sobre antibióticos e bactericidas, que são utilizados para tratamento das infecções na fermentação.

Para que o aluno possa entender melhor cada técnica a ser utilizada, as aulas 04 e 05 falam sobre meios de cultivo, formas de visualização e métodos de contagem de microrganismos, respectivamente.

Para concluir, as aulas 06 e 07 tratam especificamente das técnicas utilizadas para o monitoramento microbiológico na indústria de açúcar e álcool, visando garantir a qualidade dos produtos finais.



Projeto instrucional

Disciplina: Microbiologia Aplicada (carga horária: 60h).

Ementa: Procedimentos básicos de análises microbiológicas aplicadas ao processo de açúcar e álcool. Testes de seleção de antibióticos e bactericidas. Técnicas de verificação das áreas do processo.

AULA	OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM	MATERIAIS	CARGA HORÁRIA (horas)
1. Técnicas básicas utilizadas em microbiologia	Compreender a importância das normas de segurança em laboratório e identificá-las. Conhecer os principais materiais utilizados em laboratório de microbiologia. Compreender a importância da utilização de medidas de higiene e limpeza em laboratório, reconhecendo as principais técnicas utilizadas.	Ambiente virtual: plataforma <i>moodle</i> . Apostila didática. Recursos de apoio: <i>links</i> , exercícios.	05
2. Importância da microbiologia no processo de produção	Apresentar noções do processo de produção de açúcar e álcool. Compreender a importância e aplicação da microbiologia nas diversas etapas de produção de açúcar e álcool.	Ambiente virtual: plataforma <i>moodle</i> . Apostila didática. Recursos de apoio: <i>links</i> , exercícios.	10
3. Microrganismos relevantes em processos industriais de produção de açúcar e álcool	Apresentar os microrganismos presentes nos processos de produção de álcool. Identificar os principais contaminantes dos processos fermentativos. Apresentar o uso de antibióticos e bactericidas na fermentação.	Ambiente virtual: plataforma <i>moodle</i> . Apostila didática. Recursos de apoio: <i>links</i> , exercícios.	10
4. Meios de cultura	Definir meios de cultivo e apresentar noções dos principais tipos existentes. Caracterizar os diferentes meios de cultura e a finalidade de cada um. Apresentar o preparo de meios de cultivo importantes utilizados nos processos industriais de produção de álcool e suas aplicações.	Ambiente virtual: plataforma <i>moodle</i> . Apostila didática. Recursos de apoio: <i>links</i> , exercícios.	05
5. Técnicas de coloração e de contagem microbiológica	Conhecer as principais técnicas de coloração de microrganismos. Conhecer a técnica de coloração de Gram e sua aplicação. Conhecer as técnicas básicas de contagem microbiológica.	Ambiente virtual: plataforma <i>moodle</i> . Apostila didática. Recursos de apoio: <i>links</i> , exercícios.	05

AULA	OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM	MATERIAIS	CARGA HORÁRIA (horas)
6. Métodos microbiológicos aplicados à produção de álcool	Conhecer as principais técnicas de monitoramento microbiológico no processo industrial de produção de álcool, seus objetivos e aplicações. Apresentar os principais testes de detecção de bactérias e leveduras contaminantes, testes de sensibilidade de bactérias a antimicrobianos, caracterização de <i>Bacillus</i> e <i>Lactobacillus</i> , entre outros procedimentos.	Ambiente virtual: plataforma <i>moodle</i> . Apostila didática. Recursos de apoio: <i>links</i> , exercícios.	15
7. Microbiologia do açúcar	Conhecer os principais microrganismos contaminantes do açúcar, suas características e importância. Conhecer as principais técnicas de análises de bactérias, leveduras e bolores em açúcar. Apresentar os padrões microbiológicos nacionais e internacionais para qualidade do açúcar.	Ambiente virtual: plataforma <i>moodle</i> . Apostila didática. Recursos de apoio: <i>links</i> , exercícios.	10

Aula 1 – Técnicas básicas utilizadas em microbiologia

Objetivos

Compreender a importância das normas de segurança em laboratório e identificá-las.

Conhecer os principais materiais utilizados em laboratório de microbiologia.

Compreender a importância da utilização de medidas de higiene e limpeza em laboratório, reconhecendo as principais técnicas utilizadas.

1.1 Normas de segurança e de conduta em laboratório

O laboratório de microbiologia deve ser considerado como um local sujeito a possíveis fontes de contaminação, bem como aos mais variados tipos de acidentes envolvendo materiais, substâncias químicas e microrganismos, representando, portanto, um risco em potencial para todos os envolvidos no trabalho e manuseio. Para minimizar tais riscos é fundamental que se tomem medidas preventivas e que se conheça bem o ambiente de trabalho, para que os acidentes possam ser evitados ou controlados. Portanto, começaremos os nossos estudos apresentando as principais normas de segurança, os materiais mais frequentemente usados em laboratório de microbiologia e as formas de limpeza e desinfecção.

Algumas regras importantes devem ser observadas no exercício do trabalho em laboratório:

- a) Não consumir alimentos e bebidas no laboratório.
- b) Não fumar no laboratório.
- c) O laboratório deve ser mantido limpo e em ordem, devendo ser dele retirados quaisquer materiais que não tenham relação com o trabalho. Livros e outros objetos nunca devem ser deixados sobre a bancada de trabalho.

- d)** Usar obrigatoriamente jaleco no laboratório, abotoado ou fechado, de maneira a cobrir a maior parte do corpo.
- e)** Lavar cuidadosamente as mãos antes e depois do trabalho prático.
- f)** Não levar à boca o material de trabalho (lápiz, canetas, etc.) e evitar colocar as mãos na boca, nos olhos e no nariz.
- g)** Limpar as bancadas de trabalho com álcool a 70% antes e depois do trabalho prático.
- h)** Usar os equipamentos do laboratório apenas para seu propósito designado.
- i)** Proteger o cabelo da chama do bico de Bunsen e de contaminação microbiana.
- j)** Nunca pipetar ou sugar diretamente com a boca materiais perigosos, biológicos, cáusticos, tóxicos, radioativos ou cancerígenos. Para pipetar, usar pipetadores de borracha ou automáticos.
- k)** Transportar os meios de cultura nos suportes próprios.
- l)** Colocar o material contaminado (pipetas, espátulas, lâminas e lamínulas) após a sua utilização em recipientes próprios contendo desinfetante, para depois ser efetuada a lavagem e esterilização dos mesmos.
- m)** Relatar imediatamente ao responsável pelo laboratório qualquer acidente que provoque lesão corporal ou que origine derrame dos microrganismos para fora dos respectivos meios de cultura.
- n)** Após a quebra de qualquer recipiente contendo microrganismos, cobrir imediatamente o local com solução desinfetante e toalhas de papel, deixando agir, por no mínimo, 15 minutos.
- o)** No final da atividade, o local de trabalho deve ficar devidamente limpo e arrumado.

1.2 Materiais e equipamentos usados em laboratório de microbiologia

Autoclave – aparelho usado para esterilização de meios de cultura, líquidos, etc., através do calor úmido.

Câmara de fluxo laminar – remove as impurezas do ar por meio de um filtro absoluto. Após filtrado e puro, o ar é dirigido sobre a área de trabalho em fluxo direto, mantendo as condições de esterilidade.

Banho-maria – forma geralmente usada para aquecimento brando (até 100°C), em que se utiliza um líquido em ebulição.

Estufa de incubação – câmara de incubação para colônias de microrganismos.

Estufa de esterilização – tipo de forno utilizado para esterilização, dessecação ou secagem.

Balança analítica – usada para se obter massas de sólidos e líquidos com alta exatidão.

Bico de Bunsen – é um bico de gás, alimentado por um tubo de borracha, fixado em uma base metálica com entrada de ar, cuja chama é utilizada para técnicas de flambagem e esterilização de materiais contaminados.

Vidrarias – Erlenmeyer, proveta, balão volumétrico, béquer, pipetas graduadas, bureta, placas de Petri, tubos de ensaio, lâminas e lamínulas.

Outros – agitador para tubos; contador de colônias; exaustor; centrífuga; destilador de água; lavador de pipetas; potenciômetro; refrigerador; alça de Drigalski; etc.

Microscópio óptico – utilizado em observação de imagem ampliada até centenas de vezes por meio de dois conjuntos de lentes: as objetivas, que ficam próximas do objeto, e ampliam a imagem real; e as oculares, próximas do olho do observador, que ampliam a imagem novamente. É constituído por duas partes – uma parte mecânica e uma parte óptica. Cada parte engloba uma série de componentes constituintes do microscópio. A parte mecânica (Figura 1.1) serve para dar estabilidade e suportar a parte óptica. É constituída por base ou pé, parafusos macro e micrométricos, haste ou braço, mesa ou platina, *charriot*, presilha, tambor ou revólver das objetivas

e canhão. A parte óptica (Figura 1.1) é constituída por fonte de iluminação, lente condensadora ou condensador, botão do condensador, diafragma e pelas lentes oculares e objetivas – o conjunto de lentes que permitem a ampliação do objeto. A ampliação dada ao microscópio é igual ao produto da ampliação da objetiva pela ampliação da ocular. Devido a estes componentes serem de alta precisão e porque o microscópio é um instrumento caro, requer cuidados especiais de transporte, utilização e manutenção.

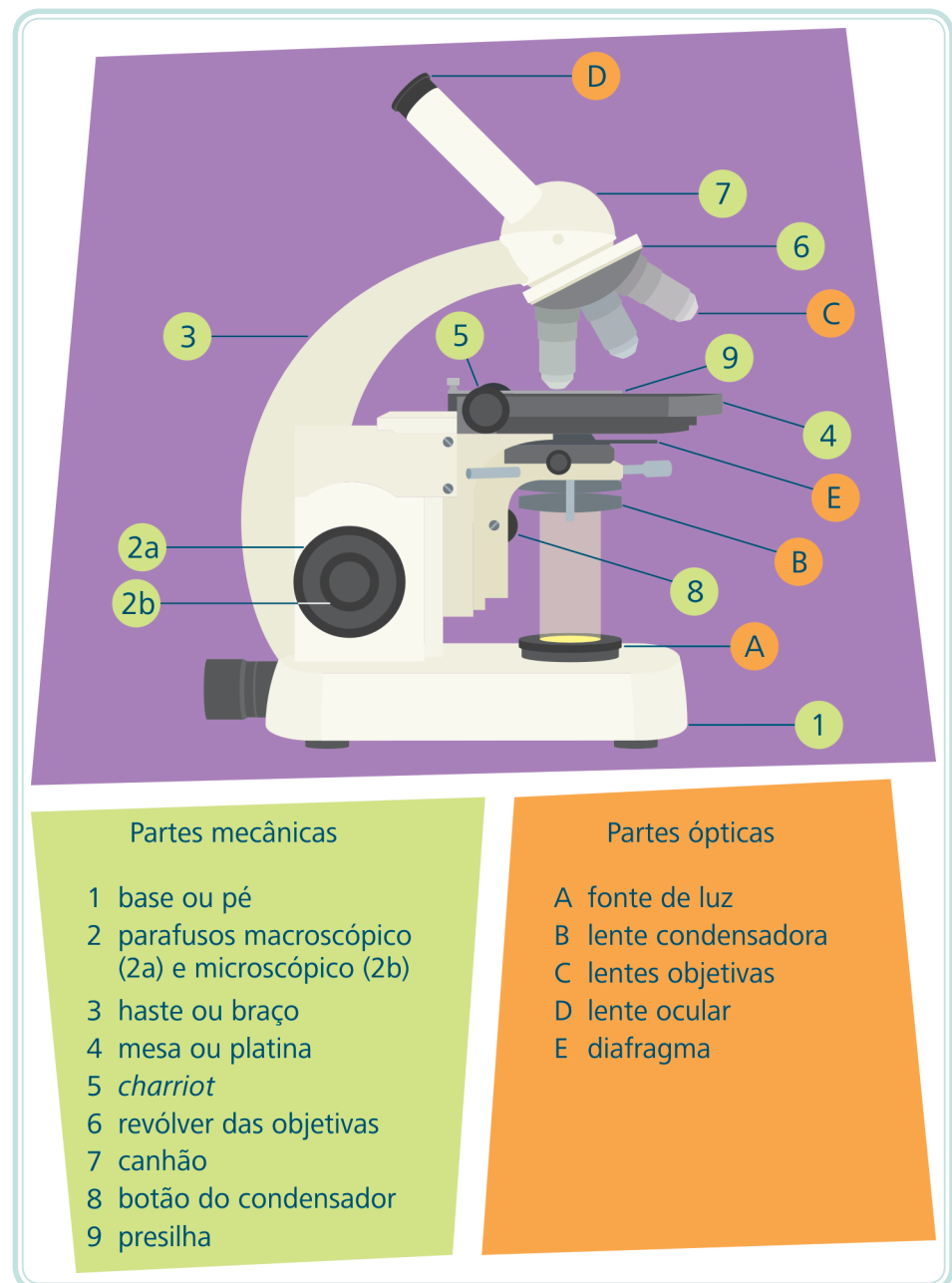


Figura 1.1: Partes do microscópio óptico

Fonte: CTISM

Câmara de Neubauer – em microbiologia, é comum o uso da câmara de Neubauer, também conhecida por “lâmina hematimétrica” ou “hemacitômetro”. É utilizada na contagem de microrganismos visíveis ao microscópio óptico, de forma precisa e rápida na quantificação de células de leveduras, esporos, bactérias e outras partículas. É uma lâmina especial de microscopia, mais espessa que uma lâmina normal, com marcações em quadrantes, precisamente divididos em 9 quadrados de 1 mm^2 de área. Como a área de cada quadrado é de 1 mm^2 , a área total compreendida pelos 9 quadrados é de 9 mm^2 . Ao se cobrir a lâmina com uma lamínula, é formado um volume sobre cada quadrado, de $0,1 \text{ mm}^3$.

O quadrado central é dividido em 25 quadrículos de $0,2 \text{ mm}$ de lado ou superfície $0,04 \text{ mm}^2$. Estes quadrículos estão subdivididos em 16 retículos de $0,0025 \text{ mm}^2$ de superfície, sendo os quadrículos separados por linhas tríplices, chegando-se assim aos 400 retículos.

Observando-se ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes, com subdivisões de tamanhos diferentes, denominados A, B e C, e que juntos formam um quadrado maior (Figura 1.2). O critério utilizado na escolha do quadrante a ser utilizado na contagem, deve ser o tamanho dos microrganismos que serão quantificados. Assim, microrganismos muito pequenos são contados no quadrante C, os de tamanho intermediário no quadrante B, enquanto os grandes são contados no quadrante A.

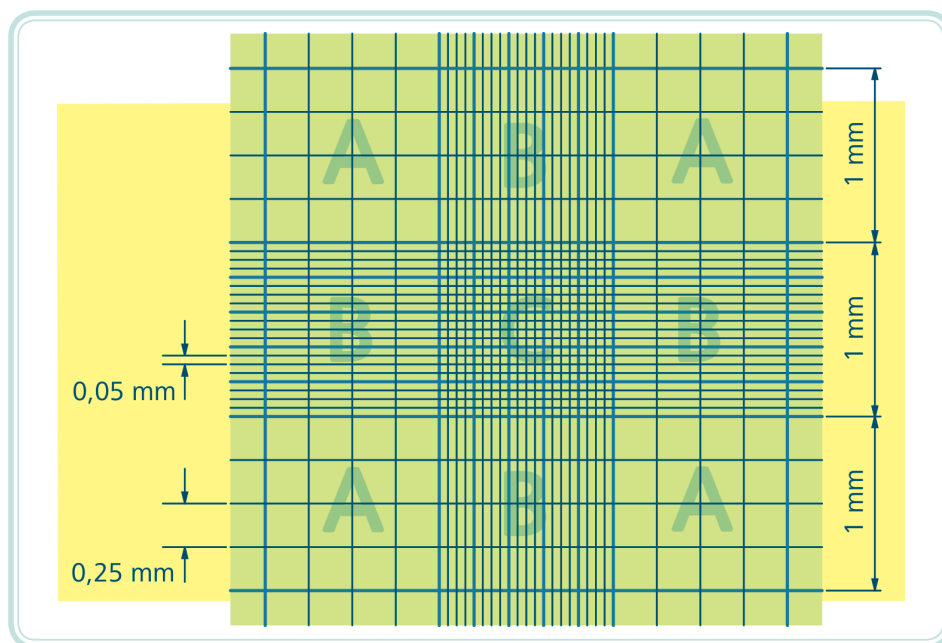


Figura 1.2: Lâmina hematimétrica ou câmara de Neubauer

Fonte: CTISM



Para saber mais sobre contagem de células em câmara de Neubauer, acesse: <http://bervieira.sites.uol.com.br/neubauer.htm>

1.3 Técnicas de esterilização e desinfecção de materiais

Em microbiologia é importante a esterilização de meios, soluções e material de vidro ou metal que se utiliza. Um produto é microbiologicamente estéril quando não contém nenhuma forma de microrganismo vivo. Para tal objetivo podem ser utilizados tanto meios físicos (como calor, radiações ionizantes e filtração), como agentes químicos, (como gás, óxido de etileno, álcool etílico a 70%, etc.).

A-Z

esterilização

Destruição ou remoção de todas as formas de vida, inclusive esporos, através de agentes físicos ou químicos.

desinfecção

Processo que promove a inibição, morte ou remoção de vários microrganismos, na forma vegetativa, (patogênicos ou não) em objetos inanimados, sem eliminar todas as formas de vida.

O calor é um dos agentes físicos mais práticos e eficientes utilizados em técnicas de **esterilização** e/ou **desinfecção**. O calor pode ser empregado por meio do controle do tempo e da temperatura, sob duas formas: seco e úmido.

1.3.1 Calor seco

Incineração – processo drástico de eliminação de microrganismos, que destrói o produto.

Ao rubro – processo onde os materiais são levados à incandescência, promovendo a destruição de todos os microrganismos.

Flambagem – processo onde o material é submetido diretamente ao fogo, seja seco ou embebido em álcool. Bastante utilizado na desinfecção de alças de vidro.

Estufa esterilizante – amplamente utilizado para vidrarias e outros materiais, submetidos à determinada temperatura.

Por meio da utilização do bico de Bunsen, através do calor seco, pode-se proceder à esterilização mantendo-se a peça na chama até se tornar incandescente. As bocas de frascos de vidro contendo os meios de cultura, devem sempre que destapados ser chamuscados à chama do Bunsen, por meio da técnica de flambagem, sem deixar que se tornem rubros. A esterilização por calor seco pode se dar ainda por exposição prolongada numa estufa a 160°C por no mínimo 45 minutos, a 170°C por 18 minutos ou 180°C por 7 minutos e meio. Este tipo de esterilização é utilizada para vidrarias, metais, placas de Petri, etc., mas não é muito efetivo contra bactérias e fungos que produzem esporos resistentes à secura.

1.3.2 Calor úmido

Outra forma de esterilização pode-se dar através do uso da autoclave, para meios contaminados com culturas de bactérias. Utiliza-se este tipo de esterilização pelo calor úmido para meios de cultura e diversas soluções. Seu funcionamento se dá semelhantemente ao da panela de pressão, no qual a água ferve sob pressão de 1,0 atm, sendo a temperatura necessária para esterilização de 121°C, e o tempo de esterilização de cerca de 15 a 30 minutos. O calor úmido inativa as bactérias por desnaturação das proteínas e ácidos nucleicos, enquanto o calor seco provoca a oxidação destas. O vapor d'água tem maior poder de penetração do que o ar, tendo maior capacidade de rompimento das pontes de hidrogênio. Devido a isso, o calor úmido pode ser considerado um processo mais eficiente do que o calor seco.

Placas de Petri de plástico com culturas, bem como outro material de plástico utilizado, após autoclavagem devem ser colocados em sacos de plástico e enviados para incineração. Vidrarias contaminadas, por sua vez, após autoclavagem devem ser lavadas com detergente neutro, rigorosamente enxaguadas, passando por água destilada e secadas em estufa. Para limpeza de materiais de vidros difíceis de serem limpos com solventes orgânicos, utiliza-se solução sulfocrômica (solução de bicromato de potássio a 3% + ácido sulfúrico concentrado).

As pipetas de vidro utilizadas no laboratório deverão ser imersas em líquido desinfetante e posteriormente lavadas e autoclavadas.

Alguns instrumentos como tesouras, pinças, etc., podem ser desinfetados mergulhando-os em álcool a 70% (70 ml de etanol absoluto e 30 ml de água destilada). As bancadas também podem ser desinfetadas utilizando-se este produto.

Em condições ideais, o laboratório deve ser isolado, ou então o trabalho deverá ser realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar.

Resumo

Nessa aula, estudamos alguns aspectos básicos envolvidos em um laboratório de microbiologia, como: as principais normas de conduta e regras de segurança, os materiais e equipamentos utilizados nesse ambiente e as formas de limpeza e desinfecção de materiais. A fixação desses conceitos é



Para saber mais sobre materiais e equipamentos de laboratório, sua limpeza e desinfecção, acesse:
http://recife.ifpe.edu.br/recife/manual_microbiologia_5_ed_2007_final.pdf

importante para o desenvolvimento de um bom trabalho no laboratório, minimizando assim os riscos de acidentes e garantindo a eficiência das práticas e de seus resultados.



Atividades de aprendizagem

1. Fale sobre a importância de se observar normas de conduta no ambiente de trabalho do laboratório de microbiologia.
2. Cite cinco medidas de segurança a serem seguidas em laboratório.
3. Cite cinco materiais utilizados em laboratório e descreva suas aplicações.
4. Diferencie esterilização e desinfecção.
5. Quais as formas que o calor pode ser utilizado para esterilização e desinfecção de materiais? Exemplifique.
6. Qual forma de utilização do calor pode ser considerada mais eficiente? Explique.

Aula 2 – Importância da microbiologia no processo de produção

Objetivos

Apresentar noções do processo de produção de açúcar e álcool.

Compreender a importância e aplicação da microbiologia nas diversas etapas de produção de açúcar e álcool.

2.1 Microbiologia na indústria de açúcar e álcool

O caldo de cana utilizado como matéria-prima na produção de açúcar e álcool normalmente apresenta uma ampla e variada microbiota, devido à associação de características consideradas fundamentais para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos, como: alto teor de nutrientes orgânicos e inorgânicos, água, pH e temperatura favoráveis.

No entanto, no decorrer de todas as etapas do processamento da cana o número de bactérias no caldo pode aumentar significativamente. Vários fatores podem influenciar nesse processo como: a qualidade da matéria-prima (cana), o tempo prolongado entre o corte e a moagem, o tempo de queima, a forma de colheita, que pode ser manual ou mecanizada, determinando a quantidade de terra agregada, o armazenamento, as condições e variações climáticas, e até mesmo a falta de higienização nos equipamentos que ficam em contato com o caldo. Durante essas etapas, a cana pode sofrer lesões que favorecem a penetração de microrganismos nos colmos, agravando o problema.

Essa contaminação do **mosto**, embora muito comum, consiste em um problema sério nas usinas de açúcar e álcool, que pode representar redução no rendimento e na produtividade da fermentação. Isso ocorre devido à formação de diversos compostos indesejáveis provenientes do metabolismo desses microrganismos, com degradação da **sacarose** e formação de ácidos orgânicos que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras, além da perda do rendimento do álcool produzido, representando prejuízos importantes para a indústria.

A-Z

mosto

Líquido apto a ser fermentado.

sacarose

Dissacarídeo (açúcar) composto por duas moléculas de açúcar simples (glicose + frutose). Basicamente, a sacarose é o principal componente da cana-de-açúcar.

A-Z

sanitização

Processo que leva à redução dos microrganismos, a níveis seguros, de acordo com os padrões de saúde pública (elimina 99,9% das formas vegetativas).

O laboratório de microbiologia dentro da usina de açúcar e álcool tem, portanto, um papel fundamental no controle de qualidade, desde a matéria-prima até o produto final. Por meio de técnicas adequadas, é possível minimizar perdas, prever e solucionar eventuais acidentes no processo de fermentação (infecção, morte de leveduras, floculação, etc.), avaliar as características do fermento utilizado nas dornas, manter a limpeza e **sanitização** durante todas as fases de processamento, realizar testes microbiológicos nos produtos finais (açúcar e álcool), contribuindo assim para o aumento na qualidade e rendimento do processo industrial.

2.2 Etapas do processamento industrial da cana-de-açúcar

Atualmente predomina no Brasil, entre as usinas mais avançadas, um modelo de produção simultânea de etanol e açúcar, a partir da mesma matéria-prima: a cana-de-açúcar.

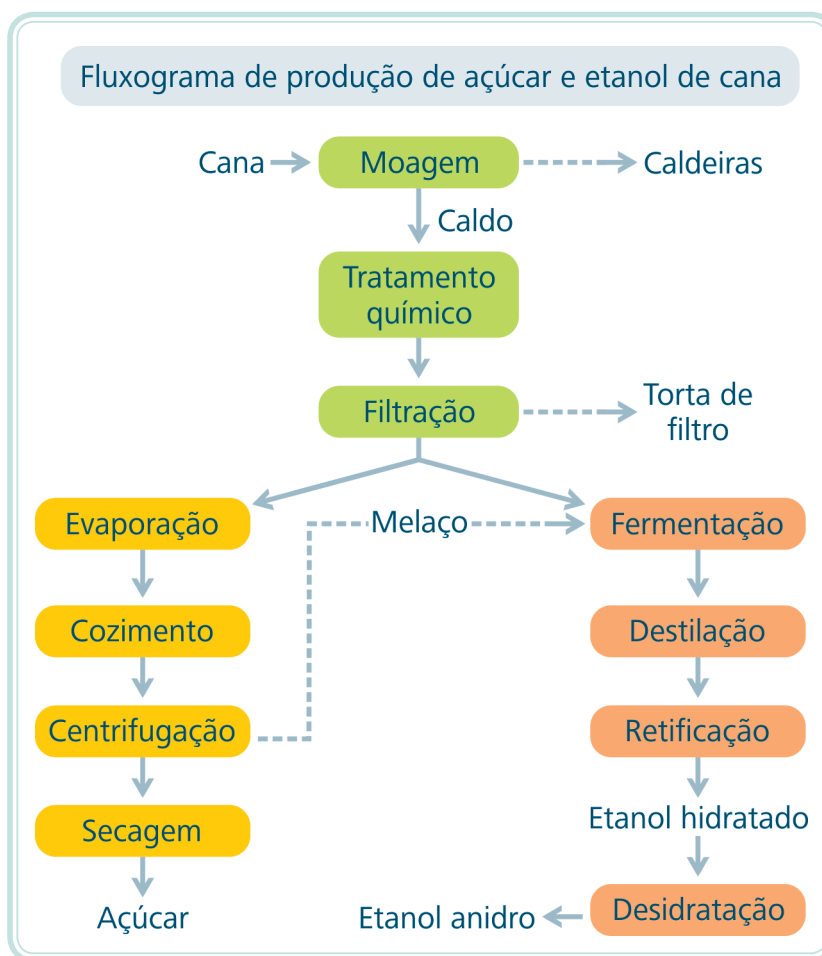


Figura 2.1: Fluxograma de produção de açúcar e álcool

Fonte: CTISM

2.2.1 Produção do açúcar

O processo de industrialização de açúcar é dividido basicamente em três etapas. Primeiro: a cana-de-açúcar é processada para extração do caldo. Segundo: o caldo é filtrado para remover qualquer impureza e fervido até o açúcar cristalizar, formando um xarope espesso. Terceiro: o xarope é passado em uma centrífuga que produz açúcar bruto e melaço. O açúcar bruto é refinado, seco e embalado. A partir daí, o melaço pode seguir a via de produção de etanol.

Seguem abaixo as principais etapas do processamento industrial da cana-de-açúcar:

- **Lavagem da cana** – lavagem da cana antes do processamento para retirar impurezas.
- **Extração do caldo** – moagem ou difusão para extração do caldo da cana através do esmagamento por cilindros compressores.
- **Peneiramento do caldo** – separação de sólidos insolúveis existentes no caldo.
- **Tratamento térmico** – processo de aumento da temperatura do caldo para promover a floculação de impurezas.
- **Evaporação** – constitui o primeiro estágio de concentração do caldo proveniente da etapa de tratamento, que contém cerca de 85% de água. A evaporação tem como objetivo reduzir essa porcentagem para aproximadamente 40%. O caldo concentrado é chamado de xarope.
- **Cozimento** – uma nova etapa de concentração do xarope, em que há a formação de cristais em virtude da precipitação da sacarose dissolvida na água. O produto final, cristais de açúcar envolvidos em mel (solução açucarada), é chamado de massa cozida.
- **Cristalização** – a massa cozida é enviada a cristalizadores que a resfriam lentamente com o auxílio de água. Dessa maneira, consegue-se recuperar parte da sacarose, que ainda estava contida no mel, por sua deposição nos cristais já existentes, gerando o consequente aumento dos mesmos.

- **Centrifugação** – a massa cozida segue às centrífugas para a separação do açúcar. O mel removido é coletado e retorna aos cozedores para um maior esgotamento. O açúcar descarregado das centrífugas apresenta alto teor de umidade (0,5 a 2%) e temperatura elevada (65 a 95°C).
- **Secagem** – os cristais de açúcar seguem para a secagem por meio de ar quente. Este açúcar pode ser comercializado desta forma como açúcar cristal, ou então, utilizado para a fabricação de outros produtos como o açúcar invertido, o açúcar refinado ou o açúcar líquido.

2.2.2 Produção do etanol

O etanol pode ser obtido por meio de um processo químico denominado fermentação, ou seja, um processo de transformação dos açúcares contidos no caldo da cana-de-açúcar e melaço. O melaço resultante é misturado ao caldo da cana-de-açúcar e à levedura em tanques. O subproduto resultante do processo de fermentação, denominado “mosto fermentado”, contém um teor alcoólico de aproximadamente 7,0% a 9,0%. Depois do processo de fermentação, de aproximadamente 10 horas, o mosto fermentado é centrifugado, de forma que a levedura possa ser separada do líquido e reaproveitada posteriormente. O mosto fermentado é então fervido a diferentes temperaturas, separando o etanol dos outros líquidos.

Seguem abaixo as principais etapas da produção de etanol:

- **Lavagem da cana** – lavagem da cana antes do processamento para retirar impurezas. Essa etapa é importante, pois possibilita a remoção parcial dos contaminantes, dependendo da qualidade da água. Se a mesma não apresentar condições microbiológicas saudáveis, pode levar, no entanto, ao aumento drástico desses contaminantes.
- **Extração do caldo** – moagem ou difusão para extração do caldo da cana através do esmagamento por cilindros compressores.
- **Peneiramento do caldo** – separação de sólidos insolúveis existentes no caldo.
- **Tratamento térmico** – processo de aumento da temperatura do caldo para promover a floculação de impurezas.

- **Resfriamento** – processo que visa adequar o caldo tratado ao processo fermentativo por meio da diminuição da sua temperatura.
- **Preparação do caldo** – a fermentação é realizada com o caldo composto de aproximadamente 20% de açúcar, preparado com caldo (do tratamento), melaço (da produção de açúcar) e água. Esse caldo deve ser mantido a uma temperatura de, aproximadamente, 30°C.
- **Fermentação** – a fermentação do caldo é resultado da ação da levedura, que primeiramente inverte a sacarose em glicose e frutose (monossacarídeo) e posteriormente converte o monossacarídeo em etanol e dióxido de carbono. Essa reação ocorre em uma dorna de fermentação, juntamente com o caldo e a levedura.
- **Centrifugação** – posteriormente à fermentação, o produto resultante é centrifugado para separar a levedura do mosto fermentado (vinho), uma solução de aproximadamente 9% v/v (°GL) de etanol.
- **Tratamento da levedura** – a levedura resultante da centrifugação é tratada com ácido sulfúrico e devolvida às dornas de fermentação para ser novamente utilizada.
- **Destilação** – o mosto fermentado (vinho) é destilado em uma sequência de colunas de destilação, separando a água do etanol. Esse processo ocorre basicamente devido às diferenças das temperaturas de ebulição do etanol e da água.



Assista ao vídeo "Açúcar e Álcool (A produção do álcool)" em:
<http://www.unica.com.br/multimedia/videocast/default.asp?mmdcode=9a64fc42-5ca7-4d66-95d3-ab2540184a38>

2.3 Análises rotineiras durante o processamento

As principais análises feitas durante o processamento encontram-se listadas abaixo e elencadas no Quadro 2.1.

2.3.1 Lavagem da cana

Na saída das caixas de tratamento de água, é feita a coleta para quantificar a população bacteriana na água de retorno do decantador, medindo o pH para correlação pH-nível bacteriano. A água de lavagem da cana deve manter o pH entre 10 e 11.

Métodos – plaqueamento, bactérias totais, pH.

2.3.2 Moagem

As amostras de caldo são coletadas na saída da primeira unidade de caldo e na saída da tubulação do caldo misto na moenda, para avaliação da alteração da carga microbiana durante a permanência no pátio e também na moenda.

Métodos – plaqueamento, bactérias totais, microscopia para bastonetes, delta pH.

2.3.3 Tratamento térmico (caldo tratado)

A amostra de caldo é coletada após a floculação das impurezas, na saída do decantador, a fim de se avaliar a eficiência do tratamento térmico no controle microbiológico.

Métodos – plaqueamento, bactérias totais.

2.3.4 Resfriamento

A amostra de caldo é coletada na tubulação de entrada e saída do trocador de calor caldo/mosto para avaliação da recontaminação do caldo resfriado e mosto.

Métodos – plaqueamento, bactérias totais, leveduras totais (saída do trocador de calor).

2.3.5 Preparação do caldo

A amostra é coletada nessa fase na tubulação de saída da água para avaliar a qualidade microbiológica da água usada na diluição do mosto, na entrada do diluidor do mosto, para avaliar a qualidade microbiológica do mosto após a adição do mel e na alimentação da dorna, para detectar a presença de contaminantes no mosto.

Métodos – plaqueamento, bactérias totais, leveduras totais.

2.3.6 Fermentação

A amostra pode ser coletada antes da centrifugação para quantificar bactérias e leveduras e avaliar a necessidade da utilização de produtos para contribuir no controle microbiológico.

Métodos – microscopia para bastonetes, viabilidade celular, brotamento, concentração celular de leveduras, nível de floculação.

2.3.7 Tratamento da levedura

A amostra é coletada para conhecer a viabilidade celular e a carga microbiana de contaminantes que entram na fermentação através do **pé-de-cuba**. Nos processos de batelada, a coleta é feita no momento de envio para a dorna e no processo contínuo, na penúltima caixa.

Métodos – microscopia para bastonetes, viabilidade celular, brotamento, concentração celular de leveduras.

A-Z

pé-de-cuba
Suspensão de células de leveduras obtidas após a centrifugação do vinho.

Quadro 2.1: Análises microbiológicas

Pontos de amostragem	Análise de rotina		
	Análise	Frequência	Análise complementar
1. Lavagem da cana	Plaqueamento Bactérias totais pH	2 vezes/semana 2 vezes/semana	Leveduras totais
2. Moagem	Plaqueamento Bactérias totais Microscopia p/ bastonetes Delta pH	2 vezes/semana 2 vezes/semana 1 vez/dia 1 vez/dia	Bactérias formadoras de ácido Bactérias formadoras de goma Leveduras totais
3. Tratamento térmico	Plaqueamento Bactérias totais	1 vez/dia 1 vez/dia	
4. Resfriamento	Plaqueamento Bactérias totais Leveduras totais	1 vez/dia 1 vez/dia 1 vez/dia	
5. Preparação do caldo			
5.1. Água de diluição	Plaqueamento Bactérias totais	2 vezes/semana 2 vezes/semana	
5.2. Mel	Plaqueamento Bactérias totais Leveduras totais	2 vezes/semana 2 vezes/semana 2 vezes/semana	
5.3. Mosto	Plaqueamento Bactérias totais Leveduras totais	1 vez/dia 1 vez/dia 1 vez/dia	Delta pH Microscopia p/ bastonetes
6. Fermentação	Microscopia p/ bastonetes Viabilidade celular Brotamento Concentr. celular leveduras Nível de floculação	25% dornas processadas/dia 1 vez/dia	Bactérias totais Bactérias formadoras de ácido Bactérias formadoras de goma Leveduras totais Coloração de Gram
7. Tratamento do fermento	Microscopia p/ bastonetes Viabilidade celular Brotamento Concentr. celular leveduras	10% cubas tratadas/dia	

Fonte: Adaptado de Faria, 2005

A-Z

Água de diluição
Água utilizada para diluir a suspensão de células de leveduras obtida por centrifugação.

Resumo

Nessa aula, vimos as principais etapas do processamento da cana-de-açúcar, relacionadas à produção de açúcar e de álcool. A partir desse conhecimento, entendemos como a microbiologia pode ser aplicada nas diferentes etapas dos processos de produção de açúcar e álcool, por meio da utilização de análises rotineiras no decorrer do processamento. Assim, compreendemos a importância da microbiologia para a produção de açúcar e álcool, através do controle e monitoramento desde a matéria-prima até o produto final.



Atividades de aprendizagem

1. Faça um fluxograma da produção de açúcar e álcool.
2. Fale sobre a importância da microbiologia aplicada à produção de açúcar e álcool.
3. Cite três etapas de produção em que podem ser feitas análises microbiológicas e descreva seus objetivos.

Aula 3 – Microrganismos relevantes em processos industriais de produção de açúcar e álcool

Objetivos

Apresentar os microrganismos presentes nos processos de produção de álcool.

Identificar os principais contaminantes dos processos fermentativos.

Apresentar o uso de antibióticos e bactericidas na fermentação.

3.1 Leveduras *Saccharomyces*

Durante os processos fermentativos em usina sucroalcooleira, é comum a presença de microrganismos, que são habitantes naturais do caldo. Em processos industriais nas usinas de açúcar e álcool, as leveduras do gênero *Saccharomyces* tem sido amplamente utilizadas, por se tratarem de microrganismos que apresentam os principais atributos desejáveis para uma cepa de uso industrial, como: rápida transformação de açúcares em álcool, atividade celular em ambiente ácido e alta tolerância às condições drásticas (produto formado, osmotolerância e grandes variações de temperatura). Devido a essas características, as leveduras têm larga aplicação na indústria de biotecnologia, sendo utilizadas também na produção de bebidas, indústria de panificação, enzimas, entre outros.

O processo fermentativo nas indústrias geralmente inicia-se com a introdução de uma determinada levedura, previamente selecionada para a condução de toda a produção, mais comumente a *Saccharomyces cerevisiae*. Os teores alcoólicos nas dornas de fermentação, em condições normais de processo, não permitem a sobrevivência de linhagens não *Saccharomyces*. Mas ao longo do processo elas podem ser substituídas por microrganismos contaminantes, como bactérias e leveduras selvagens, gerando perdas na transformação final do substrato em álcool.

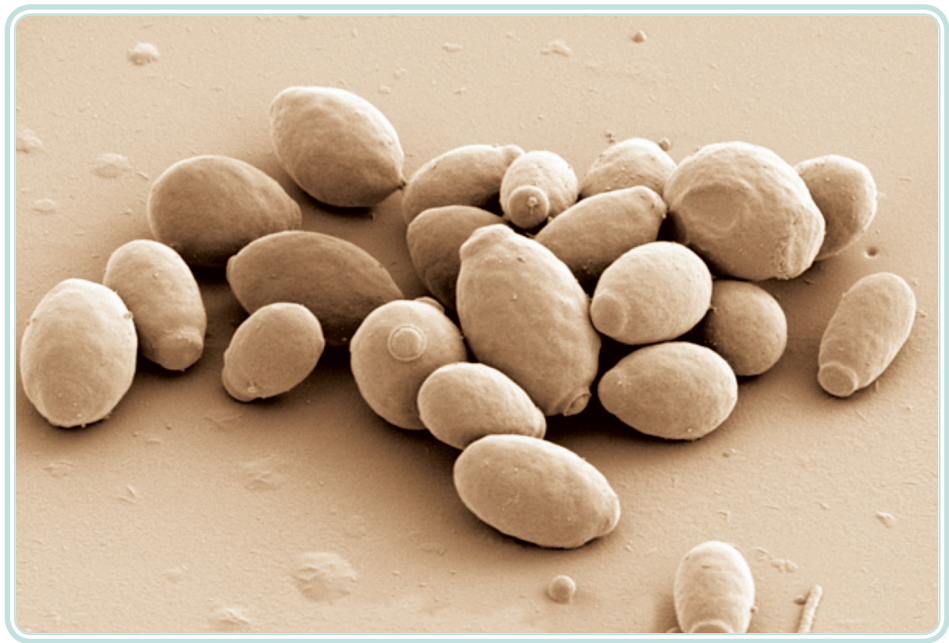


Figura 3.1: Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: <http://visualsunlimited.photoshelter.com>

3.2 Microrganismos contaminantes

3.2.1 Leveduras selvagens



Cabrini; Gallo (1999) apud Camolez; Mutton (2005), definiram levedura contaminante como qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja aquela selecionada para a condução da produção de álcool, que atuam prejudicando a fermentação, causando problemas operacionais e aumentando o tempo de fermentação.

A cana-de-açúcar utilizada como matéria-prima nas usinas sucroalcooleiras, segundo estudos, contém inicialmente níveis de 10^3 a 10^4 de fungos por grama de planta. Embora essas leveduras sejam habitantes naturais do caldo, entre elas estão leveduras que não apresentam características favoráveis à sua permanência no ambiente hostil das dornas. Elas são eliminadas naturalmente e na maioria das vezes não acarretam danos ao processo.

No entanto, as leveduras utilizadas como inóculo no início da fermentação podem ser completamente substituídas por leveduras contaminantes no decorrer da safra, também chamadas de leveduras selvagens. Isso causa sérios prejuízos como a queda no rendimento, maior tempo de fermentação no processo, problemas operacionais, formação de espumas pelo aumento

da viscosidade, etc. Contudo, alguns contaminantes podem apresentar efeito contrário, com bom desempenho fermentativo, podendo ser selecionados para atuarem como as leveduras do processo numa safra posterior.

Caso uma levedura isolada no final da safra seja diferente do inóculo introduzido no início, deve-se analisar seus aspectos bioquímicos e microbiológicos e verificar as características que permitiram seu predomínio sobre outras populações.

3.2.2 Leveduras floculantes

Na fermentação alcoólica industrial ocorre outro fenômeno importante envolvendo as leveduras, conhecido como floculação, que é um mecanismo natural e reversível de agregação de células. Esse fenômeno pode ser induzido por vários fatores, como agentes químicos, microbiológicos e fatores genéticos inerentes à própria célula.

As leveduras floculantes são consideradas como contaminantes do processo, pois causam sedimentação das células de leveduras nas dornas, levando a grandes dificuldades na fase de centrifugação, com perdas excessivas de fermento.

O mecanismo exato da floculação ainda não é conhecido, mas sabe-se que o meio de cultivo interfere no processo. Em anaerobiose, a floculação é inibida e em aerobiose, induzida.

Através de microscopia eletrônica, sabe-se que as células floculantes apresentam superfície fimbriada ou ciliada e as não floculantes, relativamente lisa.

3.2.3 Bactérias contaminantes

Um processo de fermentação considerado sadio trabalha com níveis de bactérias nunca menores que 10^5 células/ml. Assim como as leveduras nativas, essas bactérias são provenientes da matéria-prima. Por meio de técnicas adequadas de controle tanto da matéria-prima, como da água de lavagem e extração é possível obter um caldo misto com número de contaminantes inferiores a 10^7 UFC/ml e cuja faixa de pH esteja em 5,5. Como já vimos, se esses cuidados não forem observados, o nível de contaminantes pode aumentar drasticamente.

Um dos maiores problemas causados pela contaminação bacteriana é o consumo do açúcar existente (sacarose) por esses microrganismos, gerando perdas na transformação final em álcool e promovendo a formação de ácidos orgânicos, que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras. As

A-Z

UFC

Unidades Formadoras de Colônia, que corresponde ao número de células viáveis.

bactérias contaminantes presentes no mosto ou nas dornas podem causar fermentações secundárias, que levam a metabólitos que inibem a atividade das leveduras, como os ácidos, entre eles o acético, o fórmico e o láctico.

As bactérias contaminantes além de serem capazes de competir com a levedura do processo, têm que apresentar características que lhes permitam crescer em condições de altos teores alcoólicos e alta acidez. Entre as espécies de bactérias contaminantes nos processos fermentativos as predominantes são as Gram-positivas, dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Em determinadas concentrações, essas bactérias levam a uma significativa queda no rendimento alcoólico. O gênero *Leuconostoc* tem um papel importante como contaminante, principalmente na produção do açúcar. Essa bactéria utiliza o açúcar do caldo para a produção de goma, prejudicando a produção.

Algumas bactérias contaminantes do gênero *Lactobacillus* podem provocar a floculação de leveduras, como, por exemplo, *Lactobacillus fermentum*, levando a sérios problemas operacionais. Isso acontece provavelmente devido à presença de uma capa proteica de natureza gelatinosa sobre as bactérias, que possibilitam sua fixação nas células de leveduras. Segundo Rosales (1989), apud Angelis (2010), em seu estudo identificou 222 linhagens que foram isoladas na fermentação alcoólica, assim distribuídas: Gram-positivas (75,68%) e Gram-negativas (24,32%). Entre as Gram-positivas estão bastonetes (76,78%): *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. canfusus*, *L. plantarum*, entre outros; *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. firmus*; e *Sporolactobacillus* *cocos* *sp*; e *cocos* (23,21%): *Leuconostoc*, *Micrococos* e *Staphylococcus*. Entre as Gram-negativas estão *Acetobacter*, *Xantobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Enterobacter*.

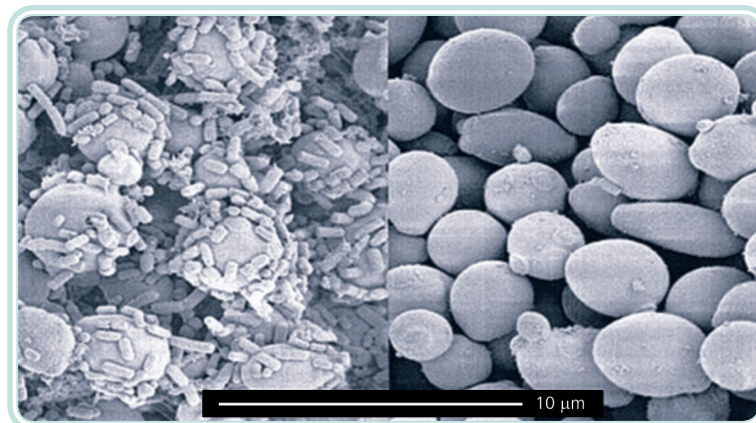


Figura 3.2: Leveduras saudáveis (do lado direito) e leveduras com bactérias contaminantes (do lado esquerdo)

Fonte: http://microbio-vocesabia.blogspot.com/2009_12_01_archive.html

3.3 Antibióticos e bactericidas

Como já vimos, o controle de contaminações microbianas em processos fermentativos é de suma importância, visto que a presença de contaminantes durante a fermentação causam uma série de problemas, interferindo na produção, rendimento e produtividade.

Dentre as principais substâncias conhecidas para a desinfecção do mosto de fermentação estão **antissépticos**, como ácido sulfúrico, compostos fenólicos, compostos clorados, quaternário de amônio, aldeídos, e os antibióticos. Estes últimos, além do emprego terapêutico, tem sido utilizados com sucesso em indústrias de fermentação na inibição do crescimento de bactérias, sem, no entanto, interferir na atuação das leveduras. Entre os antibióticos mais utilizados estão penicilina, virginiamicina, tetraciclina, cloranfenicol, além de outros como Kamoran HJ®, Kamoran WP® e Corstan®.

Os antibióticos podem ser definidos como agentes quimioterápicos, obtidos sinteticamente ou a partir de metabólitos de microrganismos, capazes de matar ou inibir o crescimento dos mesmos. Podem ser bactericidas, quando provocam a morte das bactérias, ou bacteriostáticos, quando apenas inibem seu crescimento. A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo.

Um dos fatores de maior limitação da utilização dessas substâncias na indústria está na seletividade adquirida pelas bactérias, que podem se tornar resistentes e menos sensíveis à sua ação. Devido a isso, deve-se buscar o uso racional dos antibióticos, selecionando o tipo e a dosagem mais adequada para cada população de bactérias.

Para evitar a resistência adquirida por bactérias a determinados antibióticos podem ser feitos em laboratório, testes para detectar a sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos. Por meio dessas avaliações é possível escolher quais são os mais adequados para serem aplicados na indústria sucroalcooleira. Mas isso nós estudaremos mais adiante.

A-Z

antisséptico

Produto que promove a desinfecção em tecidos vivos seja inibindo ou matando os microrganismos.

Antissépticos e antibióticos

No Brasil, não é usual a esterilização do mosto para produção de álcool. Logo, o mosto apresenta uma população natural que compete com a levedura pelo substrato, diminuindo o rendimento alcoólico. Quando se faz a clarificação do caldo por aquecimento, há uma redução dos microrganismos, mas, não é uma esterilização. Após a clarificação, o mosto é resfriado



e colocado em dornas sem cuidados para manter o ambiente livre de microrganismos. Os antissépticos e antibióticos são utilizados para o controle da contaminação, criando ambiente favorável ao desenvolvimento das leveduras. O ácido sulfúrico que se adiciona aos mostos é o antisséptico mais utilizado. Os bactericidas são empregados, em muitos casos, preventivamente. Os antibióticos, especialmente penicilinas, devido ao preço mais elevado, são aplicados em algumas usinas, de maneira corretiva. A penicilina é um bom inibidor de contaminações, devido às suas propriedades bacteriostáticas. Ela é um bom inibidor de contaminações, com emprego de 500 a 1000 U.I. por litro de mosto, normalmente implicando em aumento de rendimento em álcool. Cada processo apresenta necessidades específicas, existem também culturas e hábitos diferenciados, que definem o uso, ou não de determinado produto. Segundo Lima et al. (2001), antissépticos (exceto o ácido sulfúrico) têm uso restrito, pois existe possibilidade de deixar resíduos nos destilados.

Observações

O uso do processo *Melle-Boinot*, com tratamento ácido do fermento, centrífugas eficientes, caldo tratado termicamente, além de resfriamento mais eficiente de dornas leva a uma substancial redução na relação contaminante/levedura. Nestas condições, embora possa haver acidente de fermentação, é difícil em termos técnicos e econômicos, justificar o uso continuado de antibióticos.

Leveduras $< 10^8$ cel/mL e contaminantes $> 10^6$, pode-se usar antibiótico.

Fonte: <http://www.scribd.com/doc/22805555/Unidade-VII-Fermentacao-Alcoolica>

Resumo

Vimos nesta aula os microrganismos que são comuns ao processo fermentativo, como as leveduras do gênero *Saccharomyces*. Aprendemos sobre os principais contaminantes envolvidos, entre os quais temos leveduras selvagens e bactérias. Vimos que a presença desses contaminantes durante a fermentação é bastante prejudicial ao processo, já que eles interferem na produção, rendimento e produtividade. Diante desse problema, aprendemos que o uso de antibióticos e bactericidas tem se mostrado uma alternativa eficiente para o tratamento das infecções na fermentação.

Atividades de aprendizagem



1. Quais são os microrganismos geralmente introduzidos em usinas de produção de álcool para iniciar o processo fermentativo? Quais são as vantagens apresentadas por esses microrganismos?
2. O que são microrganismos contaminantes?
3. Cite os principais microrganismos contaminantes e as consequências para o processo fermentativo.
4. Como podem ser combatidos os microrganismos contaminantes?

Aula 4 – Meios de cultura

Objetivos

Definir meios de cultivo e apresentar noções dos principais tipos existentes.

Caracterizar os diferentes meios de cultura e a finalidade de cada um.

Apresentar o preparo de meios de cultivo importantes utilizados nos processos industriais de produção de álcool e suas aplicações.

4.1 Classificação dos meios de cultura

O estudo de bactérias e leveduras exige o prévio isolamento e identificação dos mesmos, e para tanto, são utilizados diversos meios de cultura diferentes.



O cultivo de microrganismos, em condições laboratoriais, se dá pela utilização de meios de cultura. Esses podem ser definidos como o conjunto de nutrientes necessários para haver multiplicação ou manutenção dos microrganismos. Existe uma grande variedade de procedimentos e preparações nutricionais utilizadas para induzir tal crescimento, de acordo com as exigências nutritivas e das condições físicas requeridas pelos diversos tipos de fungos e bactérias. Devido às grandes variações das necessidades nutritivas dos microrganismos, os meios de cultura são bastante diferentes em sua composição. Quanto ao estado físico, podem ser:

- **Líquidos** – são desprovidos de **ágar**.
- **Sólidos** – apresentam em sua composição de 1,5 a 2,5% de ágar.
- **Semi-sólidos** – apresentam em sua composição até 1% de ágar.

De acordo com a sua composição e os objetivos a que se destinam, os meios de cultura podem ainda ser classificados em:

A-Z

ágar

Um polissacarídeo extraído de algas, responsável pelo aspecto gelatinoso do meio sólido. O ágar é mais usado que a gelatina, pois, além de não ser atacado pela grande maioria dos microrganismos, não é liquefeito em temperaturas normalmente usadas para o crescimento dos microrganismos (em torno de 30 a 35°C).

- **Basal** – só possui os nutrientes básicos para o crescimento dos microrganismos em geral.
- **De enriquecimento** – é suplementado com nutrientes específicos para o microrganismo que se deseja pesquisar. Além disso, pode apresentar agentes inibidores de determinados microrganismos, mas não permite o seu isolamento, pois é um meio líquido.
- **Seletivo** – possui agentes inibidores de determinados microrganismos. Permite a identificação e isolamento, pois é um meio sólido (permite a visualização de UFCs).
- **Diferencial** – permite a diferenciação de uma espécie e outra pelo aspecto macroscópico de seu crescimento, como cor, textura, halo de hemólise, etc.
- **Sintético ou quimicamente definido** – são aqueles fabricados em laboratório, cuja composição química pode ser absolutamente conhecida, até mesmo em relação aos micronutrientes.
- **Complexo** – quando a composição não pode ser quimicamente conhecida, os meios de cultura são chamados complexos.
- **De transporte** – são aqueles utilizados para o armazenamento e manutenção temporária de determinado material, cuja principal função é manter a viabilidade dos possíveis microrganismos presentes.



Para saber mais sobre meios de cultura, acesse:
<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=312>



Assista as animações e saiba mais sobre técnicas assépticas de inoculação de microrganismos e obtenção de culturas puras em:
http://www.e-escola.pt/pagina_popup.asp?id=913

<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=310>

Inoculação é a transferência de um determinado número de microrganismos para um meio de cultura a fim de que estes se desenvolvam e permitam a sua identificação. A inoculação em diferentes meios envolve várias técnicas de semeadura.

As técnicas de semeadura são o método pelo qual se transfere inóculos de um meio de cultura ou material a ser analisado para um outro meio de cultura. Para garantir que apenas o microrganismo desejado seja semeado, são utilizadas as técnicas assépticas (procedimentos que devem ser adotados visando a não contaminação de materiais, meios e culturas, para obtenção de culturas puras).

Para a contagem de bactérias em geral, vários meios de cultivos podem ser utilizados, como: ágar-nutriente, dextrose-triptona ágar, ágar-leite desnatado, ágar-suco de tomate, MRS-ágar, etc. Já para a contagem de leveduras, os meios mais comumente utilizados são: extrato de levedura-peptona-dextrose-ágar, extrato de malte e ágar-batata-dextrose. A maior parte dos meios de cultura está disponível comercialmente na forma desidratada e para seu uso, faz-se a dissolução em água e esterilização.

Os meios de cultura diferenciais ou seletivos para isolamento e quantificação de populações de leveduras contaminantes baseiam-se em características fisiológicas comuns às leveduras selvagens, mas ausentes em linhagens iniciadoras do processo da fermentação. Dentre essas, destacam-se as nutricionais (variações nas fontes de carbono, nitrogênio e nos fatores de crescimento) e resistência a certos compostos como antibióticos e corantes.

Entretanto, um único meio não é totalmente satisfatório para a avaliação de todas as leveduras presentes, sendo, portanto necessário o emprego de vários tipos de meios quando se pretende detectar a maioria das leveduras presentes.

4.2 Preparo de meios de cultivo

Apresentaremos aqui uma breve noção dos meios de cultura mais utilizados para análises microbiológicas em processos fermentativos e o seu preparo.

Na contagem de bactérias totais, recomenda-se a utilização de meio de cultivo à base de extrato de levedura triptoma-dextrose-ágar (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Extrato de levedura triptona-dextrose-ágar (PCA – Plate Count Agar)

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

Fonte: Amorin, 2000

Na contagem de leveduras totais, o meio WLN (Tabela 4.2) é um dos meios de cultivo mais indicados, porém é importante considerar que os ingredientes assinalados com asterisco devem ser incorporados ao meio na forma de soluções previamente preparadas.

Tabela 4.2: WLN (WL Nutrient Medium)

Extrato de levedura	0,4 g
Caseína hidrolisada	0,5 g
Glicose	5,0 g
Fosfato monopotássico*	55,0 mg
Cloreto de potássio*	42,5 mg
Cloreto de cálcio*	12,5 mg
Sulfato de magnésio*	12,5 mg
Cloreto férrico*	0,25 g
Sulfato de manganês*	0,25 g
Verde de bromocresol	2,2 mg
Ácido nalidíxico*	5,0 mg
Ágar	2,0 g
Ampicilina*	5,0 mg
Água destilada q.s.q.	100 ml

Fonte: Ceccato-Antonini, 2004

Para a enumeração e o isolamento de leveduras resistentes à cicloheximida, recomenda-se o meio de cultivo WLD (WL *Differential Agar*) que é obtido por adição do agente antifúngico cicloheximida, na forma de solução, ao meio WLN, para uma concentração final de 5 ppm.

Para a enumeração e o isolamento de bactérias produtoras de ácido (*Pour Plate*) recomenda-se o meio de cultivo para *Lactobacillus* (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Meio para *Lactobacillus* – MRS (seg. Man. Rogosa y Sharpe) – modificado

Peptona universal	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
D ⁺ glucose	20,0 g
Di-potássio hidrogenado fosfato	2,0 g
Polioxietilensorbitan monooleato (Tween 80)	1,0 g
Acetato sódio	5,0 g
Sulfato magnésio	0,1 g
Sulfato manganês	0,05 g
Ágar	12,0 g
Água destilada	1000 ml

Fonte: Mello, 2004

Para a enumeração e o isolamento de bactérias produtoras de goma (por superfície), recomenda-se o meio de cultivo para *Leuconostoc* (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Meio para *Leuconostoc* (Mayeux e Colmer, 1961)

Extrato de levedura	20,0 g
Proteose-peptona	5,0 g
Dextrose	10,0 g
Fosfato de potássio monobásico	2,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Fonte: Amorim, 2000

Para a enumeração e o isolamento de leveduras não pertencente ao gênero *Saccharomyces*, recomenda-se o meio de cultivo de Lisina (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Meio de Lisina

<i>Bacto yeast carbon base</i>	1,17 mg
Lisina	0,10 g
Ágar	2,0 g
Ácido nalidíxico	5,0 mg
Ampicilina	5,0 mg
Água destilada q.s.q.	100 ml

Fonte: Ceccato-Antonini, 2004

Observação

Os antibióticos serão incorporados ao meio na forma de soluções.

Para a enumeração e o isolamento de leveduras selvagens do gênero *Saccharomyces*, recomenda-se o meio de cultivo LWYN (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: LWYN (*Lin Wild Yeast Medium*)

Extrato de malte	0,20 g
Extrato de levedura	0,40 g
Peptona	0,20 g
Glicose	1,00 g
Fosfato de potássio bibásico	0,10 g
Cloreto de amônio	0,05 g
Ágar	2,00 g
Violeta cristal*	0,6 mg
Mistura fucsina-sulfito	0,01 g
Ácido nalidíxico*	5,0 mg
Ampicilina*	5,0 mg
Água destilada q.s.q.	100 ml

Fonte: Ceccato-Antonini, 2004

Observação

Os ingredientes assinalados com asterisco serão incorporados ao meio na forma de soluções. A mistura fucsina-sulfito é composta de 1 parte, em peso, de dextrina, 4 partes de fucsina básica e 25 partes de sulfito de sódio anidro.

Para a enumeração e o isolamento de bactérias recomenda-se o meio de cultivo Ágar nutriente (Tabela 4.7).

Tabela 4.7: Ágar nutriente

Peptona	5 g
Extrato de carne	3 g
Cloreto de sódio	1 g
Ágar	20 g
Água destilada q.s.q.	1000 ml

Fonte: Ceccato-Antonini, 2004

Para a contagem de bactérias totais na fermentação (*Pour Plate*) recomenda-se o meio de cultura MSS (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: MSS (meio de melaço-sacarose-extrato de levedura)

Melaço	50,0 g
Sacarose	75,0 g
Peptona	1,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
$9(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Fonte: Mello, 2004



Importante

Todos os meios de cultura devem ser esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos, a 1 atm.

Resumo

Nessa aula, aprendemos sobre meios de cultura. Vimos que estes podem apresentar uma grande variação, quanto ao estado físico e quanto à sua composição, de acordo com a necessidade dos microrganismos e os objetivos a que se destinam. Para se obter resultados seguros e eficientes quando se trabalha com meios de cultura é importante observar técnicas assépticas de inoculação e semeadura. Por fim, estudamos o preparo de meios de cultivo importantes utilizados nos processos industriais de produção de álcool e suas respectivas aplicações.

Atividades de aprendizagem



1. O que são meios de cultivo?
2. Quanto ao estado físico, como os meios de cultura podem ser divididos?
3. Quanto à composição e aos objetivos a que se destinam, cite três exemplos de meios de cultura.
4. Preencha as lacunas de acordo com o meio de cultivo adequado:
 - a) Meio de Lisina.
 - b) PCA – *Plate Count Agar*.
 - c) Meio para *Leuconostoc*.
 - d) WLN.

() Meio de cultivo para isolamento de leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*.

() Meio de cultivo para contagem de leveduras totais.

() Meio de cultivo para bactérias produtoras de goma (por superfície).

() Meio de cultivo utilizado na contagem de bactérias totais.

Aula 5 – Técnicas de coloração e de contagem microbiológica

Objetivos

Conhecer as principais técnicas de coloração de microrganismos.

Conhecer a técnica de coloração de Gram e sua aplicação.

Conhecer as técnicas básicas de contagem microbiológica.

5.1 Técnicas de coloração de microrganismos

A observação de microrganismos apresenta alguns fatores limitantes, como o fato de possuírem tamanhos reduzidos e serem praticamente incolores. Por isso, a maioria dos microrganismos para serem visualizados ao microscópio óptico devem ser previamente corados. Antes disso, o microrganismo deve ser fixado à lâmina, realizando-se a secagem por simples exposição ao ar e, em seguida, rápida passagem da lâmina pela chama do bico de Bunsen.

Os corantes podem ser ácidos ou básicos. A célula bacteriana atrai corantes básicos. Os corantes básicos mais comuns são: cristal violeta, azul de metileno, fucsina e safranina.

Quanto aos tipos de coloração temos:

- a) Colorações simples** – promovem a coloração indistinta das bactérias, facilitando a visualização da forma das células bacterianas. Exemplo: coloração com azul de metileno.
- b) Colorações diferenciais** – as células bacterianas são expostas a alguns corantes, em uma determinada sequência, interagindo diferentemente com as estruturas presentes nas diferentes bactérias, permitindo a diferenciação de grupos bacterianos. Exemplo: coloração de Gram; coloração de Ziehl-Neelsen (BAAR).

- c) **Colorações especiais** – são aquelas utilizadas para corar e identificar partes ou estruturas específicas das bactérias, como: esporo, cápsula, flagelo, grânulos, e outras estruturas. Exemplo: na coloração de Fontana-Tribondeau emprega-se o espessamento de bactérias espiraladas com prata.



Para saber mais sobre técnicas de coloração Gram, acesse: <http://www.biomedicina31.com/2009/08/coloracao-de-gram.html>

Para saber mais sobre contagem de células totais pela câmara de Neubauer, acesse: <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=235&ordem=2>

5.1.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram é um método muito utilizado na identificação de bactérias, separando-as em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas (+) e bactérias Gram-negativas (-). Estas podem ser diferenciadas por variações na estrutura da parede celular. Assim a parede celular de bactérias ditas Gram (+) é formada por uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto que a parede celular de bactérias Gram (-) é formada por uma camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma camada externa de lipopolissacarídeo e proteína. É um método de coloração diferencial, baseado nas diferenças de permeabilidade destas membranas aos reagentes químicos. Nessa técnica são utilizados um corante primário (cristal violeta), um contracorante (safranina) e uma solução de lugol, denominada de mordente, pois se combina com o cristal-violeta para formar um composto colorido insolúvel. O mordente intensifica a cor por ser capaz de aumentar a afinidade do corante com a molécula alvo. Após a formação do complexo cristal-violeta-lugol é feita a descolorização com álcool. Em seguida, aplica-se o contracorante safranina.

As células que resistem à descolorização e retêm o complexo cristal-violeta-lugol, apresentam-se coradas de azul-violeta forte e são chamadas Gram-positivas (+). Aquelas que se descolorizam pela perda do complexo, aceitam o corante safranina e ficam vermelhas, são as denominadas Gram-negativas (-).

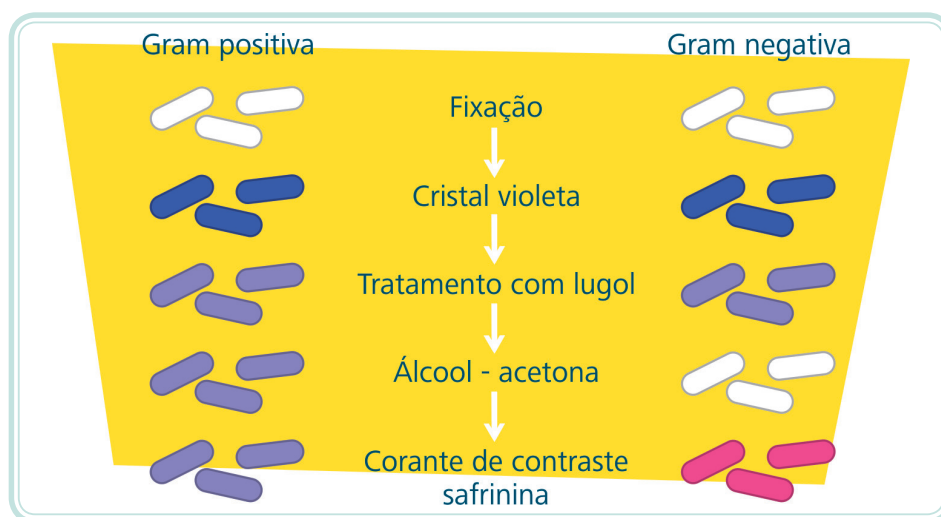


Figura 5.1: Método de coloração Gram

Fonte: Adaptado de <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/gram-st.jpg>

5.2 Técnicas básicas de contagem microbiológica

Para acompanhar o crescimento de uma população microbiana e poder quantificá-la podem ser utilizadas algumas técnicas de contagem de microrganismos. A contagem de microrganismos em uma determinada amostra pode ser realizada por meio de diferentes métodos.

- a) **Contagem direta ou microscópica** – técnica de contagem utilizada para quantificar o número total de células em uma população de microrganismos. A vantagem desse método é a rapidez, no entanto não permite a diferenciação de células vivas e mortas. Além disso, só é possível contar partículas que estejam em valores superiores a 10⁴/ml, enquanto a contagem em placas pode avaliar números bem inferiores (até 30/ml). Pode ser feita através de câmaras de contagem por observação em microscópio ou ainda por contagem eletrônica.
- b) **Contagem de microrganismos viáveis em placa** – técnica de contagem por meio da semeadura de bactérias e/ou leveduras em placas (*"Pour Plate"* ou superfície), para estimar o número de células viáveis, isto é, capazes de se reproduzir, em um meio de cultura adequado. Cada colônia crescida numa placa corresponde a uma unidade formadora de colônia (UFC) proveniente do material.

Devido à grande variação do número de microrganismos em uma amostra, a sua contagem torna-se muitas vezes impossível. Para reduzir o número de células na amostra e possibilitar a contagem são usadas técnicas de diluição (Figura 5.2). Para uma maior precisão da análise somente deverão ser contadas as placas com número de colônias entre 30 e 300.





Assista a animação e saiba mais sobre a técnica de contagem de viáveis utilizando o método das diluições sucessivas em: <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=235&ordem=3>

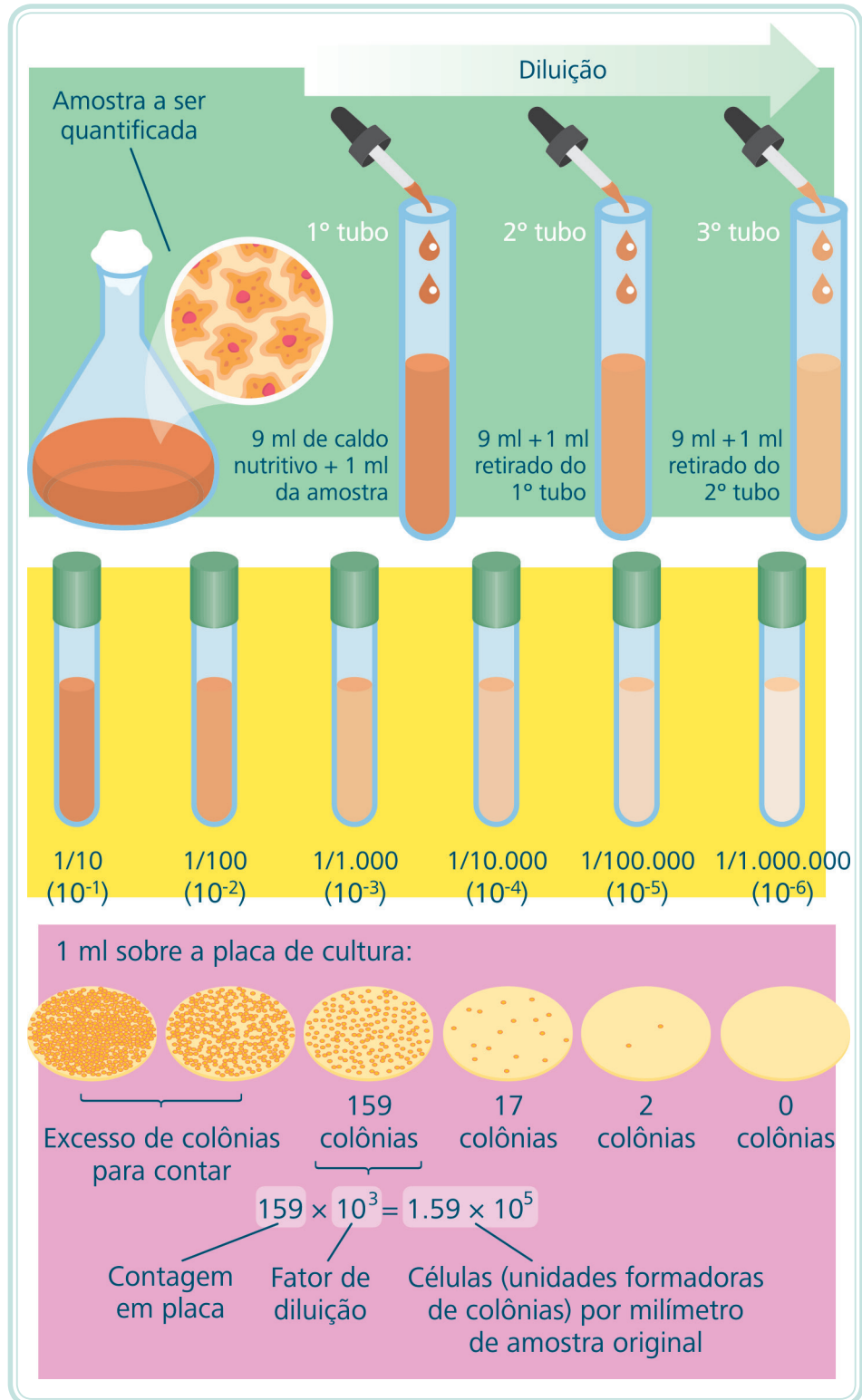


Figura 5.2: Técnica de contagem em placa com diluição

Fonte: CTISM

- c) **Semeadura em profundidade ou “Pour Plate”** – depois de preparadas as diluições, estas são inoculadas em quantidades de 0,1 ou 1,0 ml em placas de Petri estéreis, utilizando-se duas placas para cada diluição. Após colocar o material (amostra em estudo) na placa, agrega-se de 10 a 15 ml do meio de cultura fundido e resfriado a temperatura de 45°C, agitando-se em movimentos rotativos. As placas assim preparadas devem ser incubadas a temperatura e condições recomendadas, devendo ser colocadas em posição invertida na estufa. Após incubação realizar a contagem, utilizando contador de colônias.
- d) **Semeadura em superfície** – após preparar as placas com meio de cultura (15 ml) e uma vez preparadas as diluições escolhidas semeia-se 0,1 ml de cada uma das diluições, utilizando-se também duas placas por cada diluição. Distribuir toda alíquota semeada com uma alça de Drigalski. Levar à incubação nas mesmas condições descritas acima.

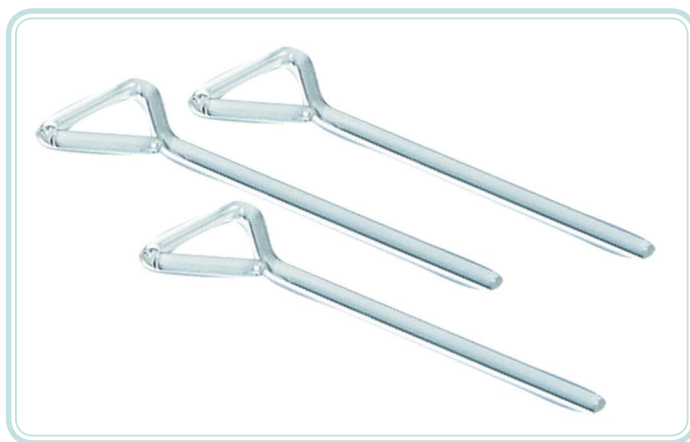


Figura 5.3: Alça de Drigalski

Fonte: <http://www.seelen-care.dk/drigalski-spatel-glas.aspx>

A seguir veja o Quadro 5.1 contendo as regras para interpretar a contagem de colônias:

Quadro 5.1: Normas para contagem de colônias

Interpretação	Exemplo	Cálculo	Reporte
1. Duas placas da mesma diluição apresentam entre 30 e 300 colônias.	Diluição 10^{-2} Placa 1 = 180 Placa 2 = 140	Média aritmética $X = 160$	Contagem 'standard' em placa: 16×10^3
2. Em uma mesma diluição uma placa apresenta entre 30 e 300 colônias e outra < 30 ou > 300. Contar as duas placas.	Diluição 10^{-2} Placa 1 = 70 Placa 2 = 26	Média aritmética $X = 48$	Contagem 'standard' em placa: 48×10^2
3. As placas de 2 diluições consecutivas apresentam entre 30 e 300 colônias. Contar as 4 placas.	a) $X \text{ Dil. } 10^{-3} = 35$ $X \text{ Dil. } 10^{-2} = 250$	Relação $10^{-3}/10^{-2}$ $35000/25000 =$ Se < que 2, tomar a média	Contagem 'standard' em placa: 30×10^3
	b) $X \text{ Dil. } 10^{-3} = 38$ $X \text{ Dil. } 10^{-2} = 150$	Relação $10^{-3}/10^{-2}$ $38000/15000 =$ Se > que 2, tomar o número maior	Contagem 'standard' em placa: 15×10^3
4. Não tem colônias nas placas da suspensão mais concentrada.	Diluição 10^{-1} Placa 1 = < 1 Placa 2 = < 1	$X = 1$	Contagem estimada em placa: $< 1 \times 10^1$
5. Duas placas da diluição mais alta apresentam mais de 300 colônias. Dividir as placas de forma radial (2, 4, 8) e contar o número de colônias por secção.	a) Diluição 10^{-3} Placa 1 = 180 em 1/4 Placa 2 = 160 em 1/4	Média aritmética $180 \times 4 = 720$ $160 \times 4 = 640$ $X = 680$	Contagem estimada em placa: 68×10^4
	b) mais de 200 em 1/8	$> 200 \text{ em } 8 = 1600$	Contagem estimada em placa: $> 16 \times 10^5$
6. Presença de colônias disseminadas em uma área menor que a metade da placa. Contar a outra metade.	Diluição 10^{-2} Placa 1 (metade) = 60×2 Placa 2 = 180	Média aritmética $X = 150$	Presença de colônias disseminadas: 15×10^3

Fonte: Ceccato-Antonini, 2004

Resumo

Estudamos nessa aula sobre as técnicas de coloração de microrganismos, que são utilizadas com o propósito de visualizá-los e identificar as suas propriedades. Vimos os principais tipos de coloração existentes, dando ênfase à coloração de Gram e à sua aplicação. Aprendemos ainda algumas técnicas de contagem de microrganismos, frequentemente empregadas para acompanhar e quantificar o crescimento de populações microbianas, como a contagem direta e a contagem em placas.

Atividades de aprendizagem



1. Quais os tipos de coloração existentes?
2. Para qual finalidade a coloração de Gram é utilizada?
3. Descreva resumidamente a técnica de coloração de Gram.
4. Após ter acessado o texto sobre contagem direta ao microscópio, discorra sobre as limitações desse método.
5. Qual o objetivo de proceder às diluições sucessivas na técnica de contagem de viáveis?

Aula 6 – Métodos microbiológicos aplicados à produção de álcool

Objetivos

Conhecer as principais técnicas de monitoramento microbiológico no processo industrial de produção de álcool, seus objetivos e aplicações.

Apresentar os principais testes de detecção de bactérias e leveduras contaminantes, testes de sensibilidade de bactérias a antimicrobianos, caracterização de *Bacillus* e *Lactobacillus*, entre outros procedimentos.

6.1 Leveduras

6.1.1 Determinação da viabilidade celular, concentração celular e brotamento em leveduras

Viabilidade celular – indica a porcentagem de leveduras vivas em relação ao total de leveduras.

Concentração celular – número de leveduras vivas por ml da amostra.

Brotamento – porcentagem de leveduras vivas que estão se multiplicando.



Até o momento, não se conhece um método absoluto para determinação da viabilidade celular de uma população de células de levedura, cujos resultados possam ser considerados totalmente seguros. Entretanto, métodos baseados no plaqueamento ou contagem direta têm sido utilizados para estimar a proporção de células viáveis em uma cultura ou processo fermentativo. Os métodos de contagem direta são rápidos e simples e permitem, simultaneamente, a observação da morfologia celular.

A tolerância da levedura ao seu produto de fermentação, o etanol, é bastante significativa em relação à eficiência de produção de álcool em fermentações

em escala industrial. A presença de álcoois superiores (n-butanol, isoamílico), ácidos graxos e seus ésteres mesmo em baixas concentrações, juntamente com o etanol, intoxicam a célula da levedura levando-a à morte e consequentemente diminuindo a viabilidade celular. Portanto, a determinação da viabilidade celular é um aspecto de grande importância no controle da fermentação alcoólica, pois pode indicar se o desempenho do processo será satisfatório ou não. Quanto maior esse número, melhor será o desempenho.

Os métodos mais empregados na determinação da viabilidade celular nos processos de produção de levedura (fermento prensado) e fermentação alcoólica (álcool) são a coloração das células da levedura com azul de metileno ou eritrosina e o cultivo por plaqueamento.

6.1.1.1 Técnica de coloração com azul de metileno ou eritrosina

A técnica de coloração com azul de metileno consiste em se misturar partes iguais da suspensão de levedura (amostra), adequadamente diluída, e da solução corante (azul de metileno). As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) apresentam-se coloridas de azul. A técnica de coloração com eritrosina é a mesma, entretanto, nesse caso, as células não viáveis colorem-se de rosa intenso. A porcentagem ou o número de células viáveis é determinado transferindo-se com uma pipeta de Pasteur a amostra para a câmara de Neubauer.

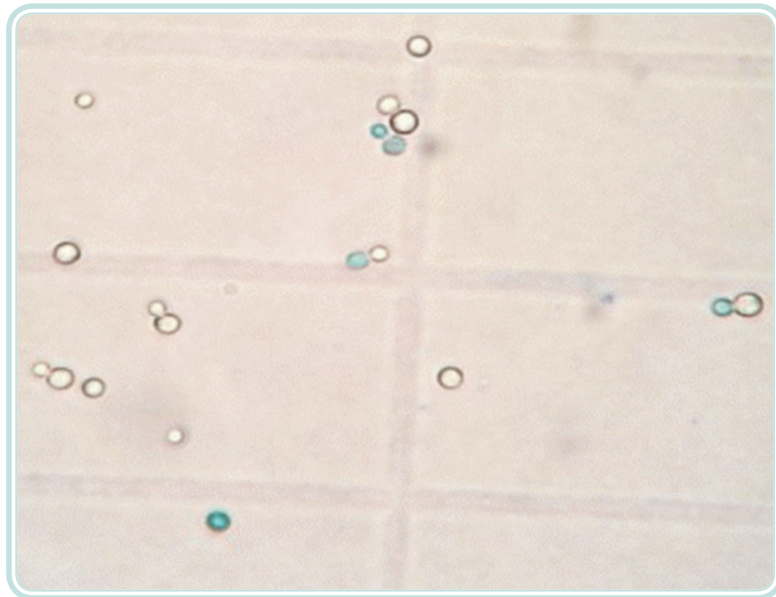


Figura 6.1: Determinação da viabilidade celular de leveduras com azul de metileno
Fonte: Ceccato-Antonini, 2004

Objetivo – determinar a viabilidade celular, o brotamento e a população de leveduras.

Material – câmara de Neubauer, pipeta de Pasteur, pipetas graduadas de 1ml, tubos de ensaio, agitador para tubos, lamínulas (24 x 24), microscópio.

Reagentes – azul de metileno ou eritrosina, solução tampão, água destilada esterilizada.

Procedimento – fazer a diluição da amostra, se necessário, em um tubo de ensaio (1:10, 1:15, 1:20, 1:40) conforme o caso específico de cada unidade. Misturar partes iguais de amostra e solução corante, homogeneizando a mistura em agitador de tubos. Em seguida, preparar a câmara de Neubauer, fixando a lamínula adequada e com auxílio da pipeta de Pasteur, transferir um pequeno volume da amostra preparada. Levar ao microscópio óptico e com a objetiva de 40x, fazer a contagem das células coradas, células não coradas e brotos. Contar 10 quadrículos de 2 colunas, de preferência, a segunda e a quarta. Considerar todas as células que estão no interior deles e as que estão até 2/3 para dentro. A diluição é feita de modo que se tenha de 40 a 50 células por quadrículo.

Observação – considerar como broto as células menores que a metade do tamanho da célula mãe.

Cálculos

Viabilidade (%) = (número de células não coradas (vivas) / número total de células) x 100

Nº total de células/ml = nº células nos 10 campos x 2,5 x diluição x 100

ou

Nº total de células/ml = nº células nos 100 retículos x 4 x diluição x 100

Brotamento por reposição (%) = (nº brotos não corados / nº total de células não coradas) x 100

6.1.1.2 Plaqueamento por profundidade (*Pour Plate*) e diluição em série

A semeadura em placas ou plaqueamento revela o número de células de leveduras capazes de se multiplicarem e formarem colônias em meios de cultivo apropriados e sob condições de incubação adequadas. Cada colônia desenvolvida supõe-se ter sido originada a partir de uma unidade viável, a qual pode ser uma célula ou mais. O resultado depende da capacidade do organismo se desenvolver nas condições dos meios de cultivo. Como consequência, essa técnica dá uma estimativa da população da amostra, já que somente as células viáveis serão quantificadas.

Como para uma maior precisão da análise somente deverão ser contadas as placas com número de colônias entre 30 e 300, uma diluição da amostra deverá ser feita antes de se proceder a sua mistura com o meio de cultura.

Objetivo – avaliar o número de microrganismos, usando-se meios de cultivo.

Material – placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas graduadas (1 ml), suporte para tubos, alça de Drigalsky, agitador para tubos, contador de colônias, estufa, banho-maria, termômetro, bico de Bunsen.

Reagentes – água de diluição, meios de cultivo específicos.

Procedimento – coletar 1 ml da amostra (suspensão de células) e transferir para um tubo de cultura com 9 ml de água ou solução salina esterilizada (diluição 1:10 ou 10^{-1}). Homogeneizar em agitador de tubos. Em seguida, pipetar 1 ml da diluição anterior para outro tubo com 9 ml de água ou solução salina esterilizada, obtendo-se uma diluição 1:100 ou 10^{-2} . Diluições maiores podem ser obtidas tomando-se 1 ml de cada diluição sucessiva e colocando em tubos com 9 ml de água ou solução salina, até se atingir a diluição desejada. Após a diluição mais conveniente, fazer a semeadura em placas de Petri, pipetando 1 ml e adicionando-se o meio de cultivo adequado liquefeito e resfriado a uma temperatura de 45-46°C. Agitar a placa com movimentos horizontais (para direita e para esquerda) para distribuir as células com uniformidade (plaqueamento em profundidade). Semear no mínimo 2 placas de cada diluição e escolher 3 diluições. Incubar a 32°C por 24-48 horas.

Alternativamente, pode-se proceder ao plaqueamento em superfície. Inicialmente colocar o meio de cultura (WLN) nas placas de Petri, esperar a solidifi-

cação e a seguir, pipetar 0,1 ml espalhando o inóculo com auxílio da alça de Drigalsky (plaqueamento em superfície).

Fazer a contagem de cada placa e para estimar o número de colônias, escolher as placas que apresentem de 30 a 300 colônias. Calcular a média das colônias das duas placas e multiplicar pelo fator de diluição para se obter o número de colônias. Se for utilizado o plaqueamento em superfície, multiplicar por 10.

Cálculo – N° de colônias na placa x índice de diluição da amostra = n° de UFCs de leveduras/ml

A contagem deve ser expressa em número de unidades formadoras de colônias por mililitro ou grama de amostra (UFC/mL ou UFC/g) e o resultado expresso em apenas dois dígitos (Exemplo: 0,0 x 10x).

6.1.2 Meios seletivos para detecção de leveduras selvagens

A diferenciação entre a levedura alcoólica (processo) e a levedura contaminante (selvagem) pode ser detectada pela utilização de meios seletivos ou diferenciais.

Como já vimos anteriormente, os meios de cultura diferenciais ou seletivos podem ser usados para isolamento e quantificação de populações de leveduras contaminantes e baseiam-se em características fisiológicas comuns às leveduras selvagens, mas ausentes em linhagens iniciadoras do processo de fermentação, ou seja, o meio empregado permite somente o desenvolvimento da levedura contaminante. Entretanto, um único meio não permite a avaliação de todas as leveduras presentes, já que todos apresentam variações. De modo geral, os meios seletivos ou diferenciais podem ser classificados em: meios para detecção de leveduras contaminantes não *Saccharomyces* (WLD, LWYN, meio de lisina) e meios para detecção de leveduras contaminantes *Saccharomyces* (LWYN).

Procedimento – coletar as amostras em frascos estéreis e homogeneizar cuidadosamente, transferindo 10 ml das amostras para tubos de centrifuga estéreis, assepticamente. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Descartar os sobrenadantes, adicionando-se em seguida solução salina estéril para ressuspensão das células. Centrifugar as amostras novamente, desprezando-se os sobrenadantes e ressuspensando-se as células a um volume final de 10

ml com solução salina estéril. Após a recomposição do volume inicial, fazer a diluição em série das amostras. Utilizar o plaqueamento em duplicata para duas diluições, de cada amostra, em cada um dos meios a serem analisados:

WLN – diluições 10^{-7} e 10^{-8} .

WLD – plaqueamento direto e 10^{-1} .

Lisina Ágar – plaqueamento direto e 10^{-1} .

LWYN – plaqueamento direto e 10^{-1} .

Utilizar a técnica de espalhamento de 0,1 ml da suspensão de células em superfície e incubar as placas a 28°C por 72 horas. Realizar as contagens das colônias.

6.2 Bactérias

6.2.1 Contagem direta ao microscópio óptico

Essa técnica é mais adequada para a contagem de bastonetes, embora outros tipos de bactérias (cocos) possam ser contados. Pode ser aplicado na contagem de bastonetes em amostras de caldos primário e misto, vinho (em fermentação ou no final de fermentação) e levedo tratado ou não. É um método rápido, de precisão relativa, sendo mais seguro e preciso quando o número de bastonetes/ml da amostra está entre 10^6 e 10^7 .

Objetivo – avaliar a contaminação em amostras de caldos primária e mista, vinho (em fermentação ou no final de fermentação) e levedo tratado ou não, por meio da contagem de bastonetes.

Material – pipetas graduadas (1 ml, 0,1 ml); lâminas (26 x 76 mm); lamínulas (22 x 22 mm ou 20 x 20 mm); tubos de ensaio; agitador para tubos; microscópio.

Reagentes – azul de metileno; sulfato azul de nilo.

Procedimento – a amostra de caldo deve ser filtrada em algodão para eliminar as impurezas sólidas. Já a amostra da dorna é utilizada da forma

como é coletada. As amostras de vinho e de levedo devem ser previamente diluídas para que a visualização ao microscópio não apresente mais que 3 a 5 bastonetes por campo. Misturar em tubo de ensaio partes iguais de corante azul de metileno/sulfato azul de nilo e da amostra a ser analisada e homogeneizá-los em agitador para tubos. Transferir 0,003 ml dessa mistura para uma lâmina de vidro, colocando sobre essa uma lamínula, sem formar bolhas. Após o preparo da lâmina, observar ao microscópio óptico com a objetiva de imersão (100x) e fazer a contagem dos bastonetes não corados (vivos). As células viáveis aparecerão incolores e as não viáveis coloridas de azul intenso. O número mínimo de campos a serem contados depende da amostra analisada, variando de 50 a 100. Exemplos:

- Caldo primário e misto = 70 campos.
- Caldo clarificado e mosto = 100 campos.
- Vinho e levedo tratado = 50 campos.

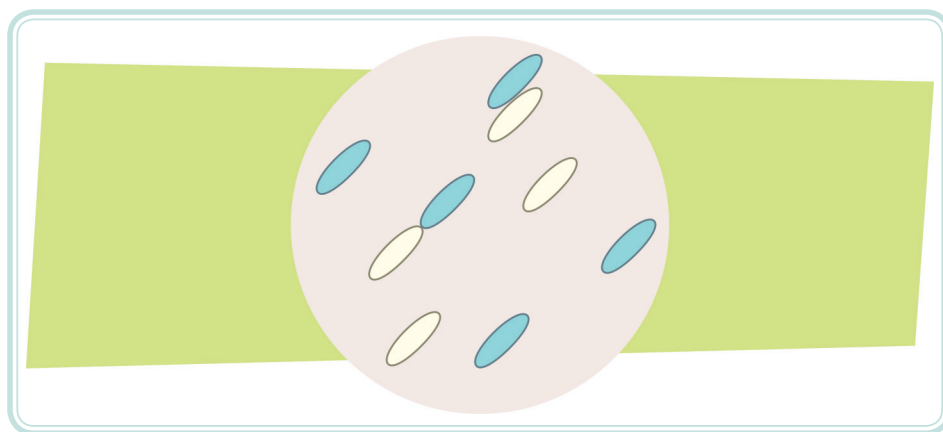


Figura 6.2: Contagem direta de bastonetes viáveis e não viáveis

Fonte: CTISM

Cálculo – $N^{\circ} \text{ bastonetes/ml} = FM \times 1 / \text{volume da amostra} \times M \times D$

Onde: FM = fator do microscópio (área preparação da lamínula / área do campo do microscópio)

M = total de bactérias vivas / n° campos contados

D = diluição usada



Para saber mais sobre a técnica,
acesse:
[http://www.e-escola.pt/topico.
asp?id=306&ordem=5](http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=306&ordem=5)

6.2.2 Plaqueamento e diluição em série

O método de contagem de bactérias por plaqueamento é o mesmo usado para as leveduras. Pode ser utilizado para qualquer amostra, como: mosto, vinho, leite de leveduras turbinado e tratado (concentrado de leveduras obtido após centrifugação), água, etc., modificando-se apenas as diluições, que variam de acordo com o material analisado e seu índice de contaminação.

6.2.3 Coloração de Gram

Objetivo – diferenciar bactérias tanto de suspensões líquidas como de colônias de cultivos sólidos, por meio de reações tinturiais da parede celular.

Procedimento – preparo da lâmina

- **Amostra líquida** – com a alça de platina, espalhar a suspensão em exame numa lâmina limpa e seca. Deixar secar e fixar por aquecimento. Deixar esfriar.
- **Cultivo sólido** – colocar uma gota de água sobre uma lâmina de vidro. Com a alça de platina, retirar uma pequena porção da colônia em cultura sólida e emulsioná-la na gota, para obter uma suspensão uniforme. Espalhar até obter um esfregaço fino. Deixar secar em temperatura ambiente, não levando diretamente à chama, para não modificar a morfologia dos microrganismos.

Antes de corar, deixar que a lâmina esfrie completamente.

Coloração – cobrir o filme fixado com o corante cristal-violeta, deixando agir por 2 minutos e depois lavá-lo para retirar o excesso. Em seguida cobrir o esfregaço com solução de iodo (lugol), que atuará como o mordente, deixando agir por mais 1 minuto e lavando-o. Neste momento, ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas adquirem cor púrpura. A lâmina é lavada sucessivamente com álcool a 95% ou com uma solução de álcool-acetona, até que a solução escorra da lâmina sem nenhuma coloração, pois estes atuam como descolorantes. Lavar em água corrente. Fazer uma contracoloração com safranina, por 1 minuto, lavando-a em seguida. Deixar a lâmina secar e examiná-la ao microscópio. As bactérias Gram-positivas retêm o corante púrpuro, mesmo após a lavagem com álcool, apresentando-se coloridas de azul-violeta intenso. Já as bactérias Gram-negativas aparecem na cor vermelha, pois retêm o contracolorante safranina.

Observação

- Essa técnica não se aplica a microrganismos que sofreram danos físicos na membrana (ação do calor).
- As células jovens têm maior afinidade pelos corantes, por isso é recomendável utilizar cultivos de 18 a 24 horas para obtenção de melhores resultados.

6.2.4 Caracterização de *Bacillus* e *Lactobacillus*

Esses dois gêneros de bactérias podem ser diferenciados por meio de alguns testes, como: coloração de Gram, detecção de esporos, motilidade e catalase. Antes de procedê-los é necessário o isolamento da cultura. Para isso, verter o meio de cultivo com inibidor de leveduras em placas de Petri, levando à estufa à 35°C por 48 horas. Isolar os diferentes tipos de colônia, transferindo-as com agulha para meio de cultivo líquido. Incubar em estufa por 24 horas e esfriar novamente, incubando em seguida por 24-48 horas. Se for observado só um tipo de colônia, o microrganismo está isolado; se não, proceder à nova purificação.

6.2.4.1 Técnica de coloração para identificação de esporos

De maneira geral, as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são capazes de formar estruturas de parede espessa, denominadas esporos ou endosporos, que lhes conferem extrema resistência às situações adversas, podendo sobreviver por longos períodos de tempo. Quando encontram-se em condições favoráveis, esses esporos germinam, dando origem a uma nova célula.

O processo fermentativo pode ser bastante prejudicado pela presença dessas formas resistentes, que podem germinar, aumentando sensivelmente a carga bacteriana, comprometendo toda a produção.

A detecção de esporos é um método de controle importante dentro da indústria sucroalcooleira. Pode ser feita por meio de cultivo em placas, depois de germinadas, ou por contagem direta ao microscópio. A técnica de coloração pode ser feita para diferenciar os esporos das células vegetativas.

A coloração é feita em esfregaço preparado da mesma forma que na técnica de Gram, adicionando sobre a lâmina de vidro gotas de solução verde malaquita 5%. Deixar colorir por 1 minuto e aquecer para emissão de vapores (não entrar em ebulição). Lavar e contracorar com safranina 0,5%. Lavar

novamente e deixar secar. Observar ao microscópio. As células vegetativas são visualizadas em vermelho e os esporos em verde.

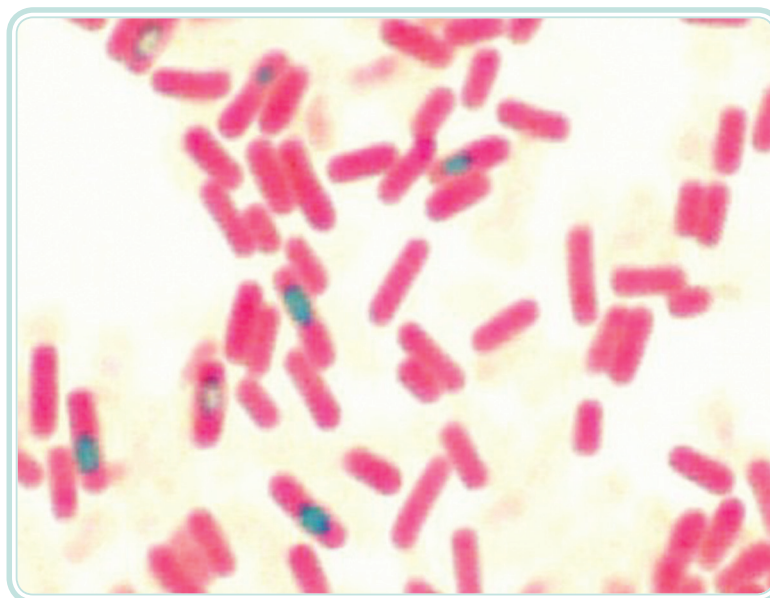


Figura 6.3: Coloração e identificação de endosporos

Fonte: http://microbiologiabrasil.blogspot.com/2008_12_01_archive.html

6.2.4.2 Teste de motilidade

Nesse teste podem ser utilizadas dois tipos de lâminas: convencional ou com concavidade para gota pendente. Será descrito o método com lâmina convencional.

Colocar sobre a lâmina uma gota de água e transferir com auxílio de uma agulha, uma porção da colônia do microrganismo, homogeneizando-a com a água. Cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio, com objetiva de imersão (100x). Se o microrganismo apresentar movimento em várias direções, ele tem motilidade.

6.2.4.3 Teste de catalase

Adicionar sobre a colônia do microrganismo uma gota de água oxigenada a 3%. Se a cultura apresentar a enzima catalase, haverá formação de efervescência pela reação de conversão da água oxigenada em água + O₂.



Figura 6.4: Teste de catalase positivo

Fonte: <http://randstarteam.blogspot.com/>

6.2.4.4 Interpretação dos resultados

Bacillus – são caracterizados por bastonetes Gram-positivos, presença de esporos, células vegetativas com motilidade e presença de catalase.

Lactobacillus – bastonetes Gram-positivos, sem esporos, células vegetativas sem motilidade e ausência de catalase.

6.3 Dextrana em caldo

Dextranas são polímeros de glicose, produzidos a partir de sacarose principalmente por bactérias do gênero *Leuconostoc*.

A penetração de microrganismos no colmo, através de rachaduras, contamina a cana formando dextranas, cuja presença afeta a qualidade do açúcar e a eficiência industrial. Ocorre perda de sacarose, aumento da viscosidade do caldo e dificuldade de filtração no processo industrial.

Objetivo – obtenção de um parâmetro a ser usado na avaliação da qualidade da matéria-prima.

Material – pipetas (1 ml, 10 ml, 25 ml); béquer (100 ml); balões volumétricos (25 ml e 100 ml); tubos de ensaio; funil com filtro de vidro sintetizado (3D4); espectrofotômetro; bureta (5 ml); centrífuga; tubos de centrífuga; papel de filtro; banho-maria.

Reagentes – dextrana; ácido tricloroacético a 10%; etanol absoluto; etanol a 80%; NaOH 2,5N (saturada com Na_2SO_4); reagente alcalino cúprico; H_2SO_4 (2N); fenol 5%; H_2SO_4 concentrado.

Procedimento – transferir 1 ml de solução de NaOH (2,5N) (saturada com Na_2SO_4) para tubo de centrífuga. Adicionar 5 ml de solução problema. Adicionar 1 ml do reagente alcalino cúprico - solução de trabalho. Deixar em água fervente por 5 minutos. Esfriar. Centrifugar a 5.000 rpm por 20 minutos. Desprezar o sobrenadante. Adicionar 7 ml da solução de lavagem, suspender e agitar o precipitado. Centrifugar novamente. Desprezar o sobrenadante, inverter os tubos e deixar cinco minutos gotejando. Dissolver o precipitado com 2 ml de H_2SO_4 (2N) e transferir para balão de 25 ml. Lavar com mais 2 ml de H_2SO_4 (2N) e depois com água até 25 ml. Agitar. Transferir 2 ml para tubos de ensaios padronizados. Adicionar 1 ml de solução de fenol 5%. Adicionar 5 ml de H_2SO_4 concentrado, devendo ser colocado rapidamente e no centro da solução. Usar bureta com ponta raspada. Colocar os tubos em banho-maria fervente durante 2 minutos. Esfriar. Fazer a leitura a 485 nm (filtro 50).

Observação – usar 2 ml de padrão de trabalho e 2 ml de água destilada como prova em branco.

Preparo do padrão de trabalho – deixar a dextrana, no mínimo, uma semana em dessecador a vácuo. Pesar uma quantidade de dextrana que contenha 250 mg de dextrana pura e dissolver em água até 100 ml (solução estoque). Diluir 10 ml a 250 ml com água destilada obtendo-se o padrão de trabalho que deve conter 0,02 mg/ml.

Cálculo – $\text{ppm de dextrana} = 400 \times (\text{La} - \text{Lb}) / (\text{Lp} - \text{Lb})$

Onde: La = leitura da amostra

Lb = leitura do branco

Lp = leitura do padrão

6.4 Delta pH

Objetivo – determinação da atividade microbiana (produção de ácidos) em caldos e mosto.

Material – béquer de 250 ml; proveta de 100 ml; banho-maria ou estufa; bureta; pHmetro.

Reagentes – NaOH (1N); H₃PO₄ (1N).

Procedimento – coletar amostra de caldo (primário, misto, mosto) e filtrar, se necessário. Transferir 100 ml para um béquer e ajustar o pH para 5,5 (pH inicial, com NaOH (1N) ou H₃PO₄ (1N)). Incubar a 37°C por 4 horas em banho-maria ou estufa. Determinar o pH após incubação (pH final).

Cálculo – $\Delta \text{pH} = \text{pH inicial} - \text{pH final}$

6.5 Acidez sulfúrica

Objetivo – determinar a acidez em uma amostra de caldo e mosto.

Material – béquer de 100 ml; bureta de 10 ml; pipeta volumétrica de 20 ml; proveta de 50 ml; pHmetro.

Reagentes – NaOH (1N).

Procedimento – transferir 20 ml da amostra para um béquer de 100 ml. Adicionar 50 ml de água destilada. Titular com NaOH (0,1N) até pH 8,5.

Cálculo – $\text{Acidez} = \text{volume gasto de NaOH} \times \text{fator } 0,245 \text{ (g/L)}$

6.6 Nível de floculação

Objetivo – avaliar o nível de floculação em vinho bruto.

Material – proveta (100, 500 ou 1000 ml).

Procedimento – coletar uma amostra do vinho na dorna, antes de centrifugar. Agitar para liberação de CO₂. Colocar a amostra na proveta. Anotar o volume do sobrenadante após 15 minutos.

Expressar os resultados em % de floculação.

6.7 Teste de sensibilidade de bactérias a antimicrobianos

A avaliação de antimicrobianos utilizados na indústria alcooleira pode ser feita através de algumas metodologias diferentes. Em nosso estudo apresentaremos um método que se baseia na variação da acidez do meio e outro pela determinação da variação da absorbância, determinada por espectrofotometria.

6.7.1 Teste de variação da acidez

6.7.1.1 Preparo das soluções-estoque

- a) **Solução-estoque actidiona (inibidor de leveduras)** – pesar 0,1 g de actidiona e dissolver em 100 ml de água destilada.
- b) **Solução-estoque de HJ** – pesar 0,01g de HJ, solubilizar em algumas gotas de álcool e dissolver em 100 ml de água destilada.
- c) **Solução-estoque de virginiamicina** – pesar 0,01 g de virginiamicina, solubilizar em algumas gotas de álcool, dissolver em 100 ml de água destilada.
- d) **Solução-estoque de penicilina** – pesar 0,01 g de penicilina e dissolver em 100 ml de água destilada.

6.7.1.2 Procedimento

Preparar 4 Erlenmeyers de 250 ml, da seguinte forma:

- a) **Erlenmeyer 1 – Testemunha** – colocar 70 ml de mosto de alimentação + 30 ml de vinho bruto + 1 ml da solução-estoque de actidiona.
- b) **Erlenmeyer 2 – Tratamento HJ 3 ppm (HJ)** – colocar 70 ml de mosto de alimentação + 30 ml de vinho bruto + 1 ml da solução-estoque de actidiona + 3 ml da solução-estoque de HJ (= 3 ppm).
- c) **Erlenmeyer 3 – Tratamento virginiamicina 3 ppm (V)** – colocar 70 ml de mosto de alimentação + 30 ml de vinho bruto + 1 ml da solução-estoque de actidiona + 3 ml da solução-estoque de virginiamicina (= 3 ppm).
- d) **Erlenmeyer 4 – Tratamento penicilina (5 ppm) (P)** – colocar 70 ml de mosto de alimentação + 30 ml de vinho bruto + 1 ml da solução-estoque e de actidiona + 5 ml da solução-estoque de penicilina (= 5 ppm).

Assim, temos:

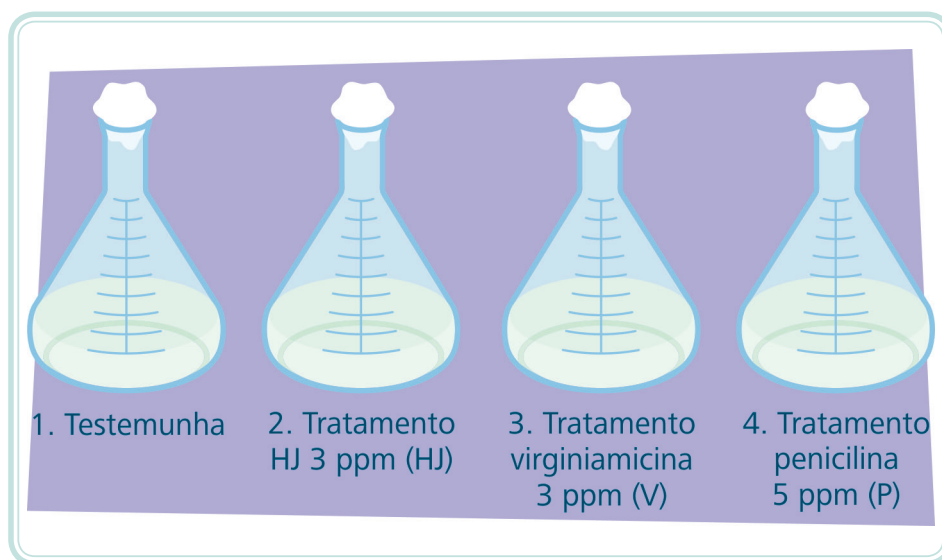


Figura 6.5: Teste de variação de acidez

Fonte: CTISM

Em seguida, retirar 20 ml de cada Erlenmeyer para determinar a acidez inicial e, imediatamente incubá-los em estufa a 35°C por, aproximadamente, 6 horas. Após esse período, retirar os Erlenmeyers da estufa e novamente determinar a acidez (acidez final).

6.7.1.3 Determinação da acidez

Determinar a acidez sulfúrica das 4 amostras (acidez inicial).

Procedimento – utilizar 20 ml da amostra + 50 ml de água destilada, ferver por 2 minutos, e titular com NaOH 0,1N, até pH = 8,5. Anotar o volume gasto para cada amostra.

Cálculo – Acidez (g H₂SO₄) = Volume de NaOH gasto x 0,245 x fator do NaOH

6.7.1.4 Interpretação dos resultados

Calcular a variação da acidez (acidez final – acidez inicial) para as 4 amostras. A amostra que apresentar a menor variação da acidez provavelmente corresponderá ao antibiótico mais recomendado para ser dosado na fermentação.

No exemplo da Tabela 6.1, o HJ foi o mais indicado, seguido da virginiamicina, e por último, a penicilina.

Tabela 6.1: Variação de acidez das amostras

	T	HJ (3 ppm)	V (3 ppm)	P (5 ppm)
Acidez inicial	0,82	0,84	0,84	0,83
Acidez final	1,31	0,88	0,91	0,98
Variação da acidez	0,49	0,04	0,07	0,15

Fonte: Amorim, 2000

6.7.2 Δ absorbância

Material e equipamentos – tubos de ensaio com tampa rosqueável; suporte para tubos de ensaio; pipetas esterilizadas de 2 ml e 10 ml; béquer; estufa de esterilização; estufa incubadora; autoclave ou similar; aquecedor com agitação; espectrofotômetro.

Meio de cultivo – YEPD.

Reagentes e produtos a serem testados – actidiona 10 ppm; KAMORAN®; KAMORAN WP®; CORSTAN®; HJ GOLD®; SPECTRAN 100E®; TOP MIX®; VIP-QR®.

Preparo do inóculo – adicionar a um tubo contendo 9 ml de meio de cultivo YEPD esterilizado, 1 ml da amostra (vinho bruto coletado das dornas) a ser testada. Incubá-la por 24 horas a 35°C.

Observação – manter o bico de Bunsen aceso sobre a bancada de trabalho, por 30 minutos antes do início do teste e durante o mesmo.

Procedimento – adicionar assepticamente 2 gotas de solução de actidiona a 10 ppm (inibidor de leveduras) em tubos de ensaio contendo 9,7 ml de meio de cultivo YEPD esterilizado. Utilizar 2 tubos (A e B) para cada concentração de cada antibiótico a ser testado, um tubo para prova em branco e outro para calibração do aparelho. Identificar os tubos. Adicionar nos tubos A e prova em branco 0,3 ml do inóculo obtido anteriormente. Os tubos B para calibração não serão inoculados. Dosar os produtos a serem testados nos tubos identificados como A e B. Agitar os tubos. Efetuar a leitura inicial da absorbância, de todos os tubos, a 520 nm em espectrofotômetro imediatamente após a dosagem dos produtos, usando para calibração do aparelho o tubo reservado para tal (YEPD esterilizado). Incubar os tubos a 35°C por 6 horas. Efetuar a leitura final de todos os tubos nas mesmas condições em que a leitura inicial foi obtida.

Resultado – Δ absorvância = absorvância final (tubo Ax) – absorvância inicial (tubo Ax).

O produto que, comparativamente e nas mesmas condições de teste, apresentar a menor Δ absorvância, será considerado o mais eficiente frente aos contaminantes testados.

Observação – o Δ absorvância obtido pelas leituras dos tubos B (sem inóculo) deve ser o mais próximo de zero possível. Se isso não ocorrer, deve-se recorrer a outra metodologia para o teste, pois a interferência dos próprios produtos testados nos valores de absorvância invalida o teste.

Resumo

Nessa aula, conhecemos as principais técnicas de monitoramento microbiológico empregadas no processo industrial de produção de álcool. Entre elas, aprendemos métodos aplicados ao controle da viabilidade celular, concentração celular e brotamento em leveduras, identificação de bactérias e de leveduras contaminantes, com seus objetivos e procedimentos específicos, além da caracterização de *Bacillus* e *Lactobacillus*, contaminantes de grande incidência nos processos de produção. Vimos também testes de sensibilidade de bactérias a antimicrobianos, que são úteis para evitar a resistência adquirida por bactérias a determinados antibióticos, possibilitando o uso racional desses medicamentos na indústria sucroalcooleira.

Atividades de aprendizagem



1. Defina viabilidade celular, brotamento e concentração de leveduras.
2. Com base nos dados abaixo, calcule a viabilidade celular, a porcentagem de brotamento e a população de leveduras:

Total de células vivas = 500

Total de células mortas = 50

Total de brotamentos vivos = 30

Diluição = 1:20

3. Explique por que a determinação da viabilidade celular é um parâmetro importante para o controle do processo fermentativo.

4. Quais as técnicas utilizadas para determinar a viabilidade celular?

5. Considerando-se a técnica de "*Pour Plate*", determine o número de células de levedura/ml (expresse em UFC/ml):

Diluição = 1/10.000

Nº colônias = 32

6. Como é possível fazer a detecção de leveduras selvagens? Explique.

7. Calcule o nº bastonetes/ml da seguinte amostra:

Nº campos = 60

Diluição da amostra = 1:2

FM = 14017,9

Volume da amostra = 0,002 ml

Nº bastonetes contados = 263

8. A técnica da coloração de Gram não pode ser feita em microrganismos que tiveram suas membranas danificadas fisicamente. Explique por quê.

9. Após a realização dos testes de coloração de Gram, detecção de esporos, motilidade e catalase para proceder à caracterização dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, como essas bactérias podem ser diferenciadas?

Aula 7 – Microbiologia do açúcar

Objetivos

Conhecer os principais microrganismos contaminantes do açúcar, suas características e importância.

Conhecer as principais técnicas de análises de bactérias, leveduras e bolores em açúcar.

Apresentar os padrões microbiológicos nacionais e internacionais para qualidade do açúcar.

7.1 A importância da microbiologia do açúcar

O açúcar produzido pelas usinas deve seguir padrões microbiológicos de qualidade que permitam seu consumo de forma segura em bebidas, alimentos enlatados, doces, etc., a fim de não causar não só prejuízos econômicos, mas principalmente os relacionados à saúde de seus consumidores.

Dentre os microrganismos presentes no ambiente de fabricação dos açúcares estão bactérias, fungos e leveduras, cujo monitoramento é de grande importância para a manutenção da qualidade do produto. Os fatores que contribuem para a ocorrência de microrganismos nas indústrias do açúcar resultam, na sua quase totalidade, do baixo número de medidas de qualidade e da ignorância ou inobservância das normas básicas dos procedimentos de manipulação dos alimentos, como a aplicação das boas práticas de fabricação (BPF), que são imprescindíveis para produção de alimentos microbiologicamente seguros. As medidas de qualidade devem ser implantadas em todas as etapas de processamento do açúcar, a fim de minimizar os problemas e proporcionar a produção de produtos que atendam aos padrões internacionais de qualidade.

7.2 Principais microrganismos relacionados ao processo de fabricação do açúcar

7.2.1 Mesófilos aeróbios totais

As espécies mais frequentemente encontradas em alimentos são provenientes do solo. Crescem em temperaturas entre 20 e 40°C, em meio com pH 5,0 a 9,0. São bastonetes Gram-positivos, aeróbios e anaeróbios facultativos. São representados especialmente por bactérias do gênero *Bacillus*. Todas as espécies desse gênero produzem esporos em meios aeróbios, o que lhes confere resistência às condições adversas (antibióticos, extremos de temperatura, etc.).

7.2.2 Bolores e leveduras

São microrganismos amplamente distribuídos no meio ambiente, e se desenvolvem em meios menos favoráveis ao desenvolvimento bacteriano, como baixos valores de pH, altas concentrações de sal ou de açúcar, baixa temperatura de armazenagem, presença de antibióticos e exposição à irradiação. Podem causar deterioração em alimentos, alterar o sabor, causar perda de odores, provocarem descoloração da superfície dos alimentos e levar à produção de metabólitos tóxicos.

A cana e o solo são as principais vias de entrada destes microrganismos na indústria.

7.2.3 Esporos termófilos produtores de *flat-sour* (acidez plana)

As bactérias produtoras de "*flat-sour*" são consideradas termófilas obrigatórias porque se desenvolvem bem entre 55 a 65°C e seus esporos possuem extrema resistência a elevadas temperaturas. São difíceis de serem destruídos no alimento ou na indústria de processamento. Elas promovem a acidificação dos produtos, por meio da redução do pH, sem haver produção de gás. São responsáveis pela deterioração de alimentos enlatados. Esta deterioração é chamada de "*flat-sour*" (acidez plana), já que este microrganismo praticamente não produz gás, não provocando alterações nas embalagens. São bactérias encontradas no solo.

7.2.4 Esporos termófilos produtores de H₂S (bactérias de deterioração sulfídrica)

São bactérias que promovem deterioração em alimentos enlatados de baixa acidez, como milho, ervilha, cogumelo, tornando os alimentos enegrecidos, com odor característico de sulfeto de hidrogênio (semelhante a ovo podre), sem mostrar, no entanto, sinais de estufamento. Estas bactérias podem contaminar o açúcar, se a temperatura de aquecimento (no processo de fabricação de açúcar cristal) não for suficiente para a inativação dos esporos. São encontradas no solo.

7.2.5 Esporos termófilos produtores de gás (não produtores de H₂S)

São microrganismos anaeróbios obrigatórios, não produtores de H₂S. Apresentam intensa produção de ácido e gás, sendo altamente sacarolíticos, e seus esporos têm elevada resistência ao calor. A espécie mais importante é *Clostridium thermosaccharolyticum*. Essas bactérias não são produtoras de toxinas ou infecções, diferentemente de algumas bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium spp*, que produzem poderosas neurotoxinas, como *C. tetani* e *C. botulinum*, sendo consideradas patogênicas e de grande importância na saúde pública. As bactérias produtoras de gás, no entanto, causam deterioração nos alimentos como açúcar, farinha, cereais, produtos enlatados, etc. São encontradas no solo.

7.2.6 Coliformes totais e fecais

São enterobactérias, frequentemente encontrados no trato intestinal de animais, como *Escherichia coli*, e algumas espécies são encontradas em vegetais, como *Enterobacter aerogenes*. Crescem em vários substratos e utilizam carboidratos ou outros compostos orgânicos como fonte de energia. São capazes de produzir quantidades consideráveis de ácidos e gás a partir de açúcares, como a lactose. Causam sabores e odores desagradáveis nos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo humano. São considerados como indicadores de contaminação fecal e não se admite a sua presença em alimentos.



Figura 7.1: *Escherichia coli*

Fonte: <http://archive.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2038>

7.2.7 *Salmonellas*

São enterobactérias, Gram-negativas, não esporuladas. Também fazem parte das enterobactérias patogênicas, causadoras de problemas gastrointestinais para o homem e animais. A via direta de entrada são os alimentos e as amostras de açúcar que apresentam esse microrganismo, estando fora dos padrões microbiológicos.

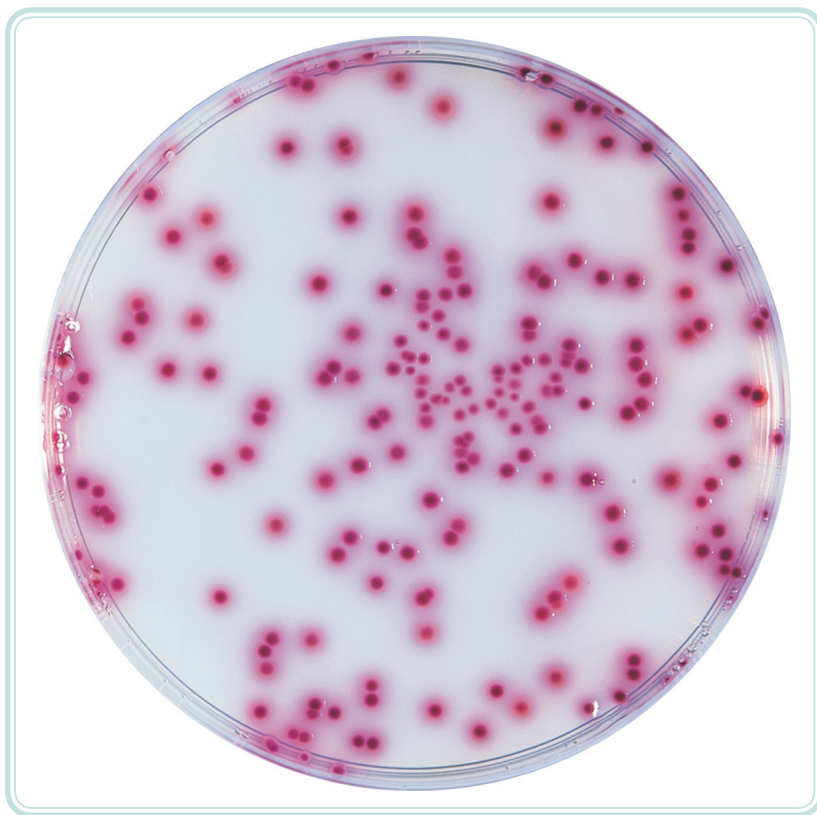


Figura 7.2: *Salmonellas*

Fonte: http://www.solabia.fr/solabia/produitsdiagnostic.nsf/sw_prod/8af14c118957deb2c12574c90031dbbd?opendocument&lg=en&

7.2.8 *Bacillus cereus*

São bactérias Gram-positivas, cuja faixa de pH para crescimento está entre 4,9 e 9,3. São produtoras de toxinas, que podem levar a dois tipos de intoxicações, causando dores abdominais, diarreia intensa, náuseas moderadas e raramente vômitos na forma clássica e na segunda forma, náusea aguda seguida de vômito. São amplamente distribuídas, podendo ser encontradas no solo, poeira e água.



Figura 7.3: *Bacillus cereus*

Fonte: <http://archive.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccimages/articleimages/atlas-bld/bacillus%20cereus%20fig2.jpg>

7.2.9 *Staphylococcus aureus*

São bactérias Gram-positivas, encontrados em cavidades nasais, garganta e trato intestinal. Sua presença em alimentos indica manuseio inadequado, com contaminação a partir da pele, boca e fossas nasais dos manipuladores, bem como limpeza e sanitização inadequada dos materiais e equipamentos. Algumas cepas são produtoras de toxinas, causando intoxicações alimentares. Os sintomas da contaminação por *S. aureus* mais comuns incluem náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia.

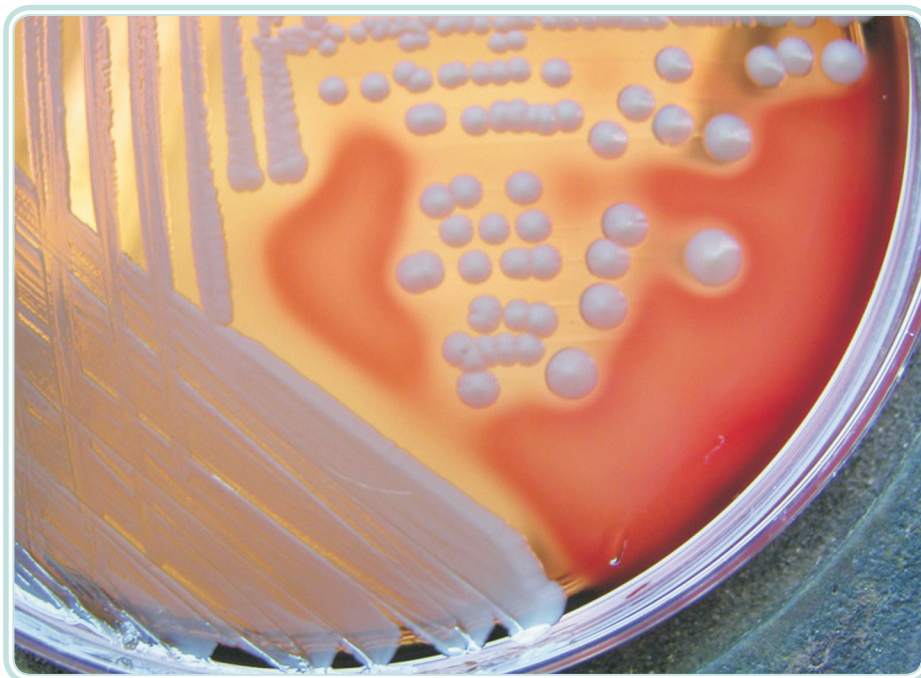


Figura 7.4: *Staphylococcus aureus*

Fonte: http://archive.microbelibrary.org/asmonly/details_print.asp?id=2040&lang=

7.3 Análises microbiológicas

As amostras devem ser as mais representativas possíveis do lote a ser analisado. Deve-se coletar diariamente 50 g de açúcar para compor amostras semanais ou mensais, acondicionando em frascos esterilizados. Para a execução das análises pesar 20 g de açúcar, de cada amostra, em Erlenmyer de 250 ml, previamente estéril. Adicionar 100 ml de água destilada e esterilizada. Agitar até a completa dissolução do açúcar.

7.3.1 Contagem de bactérias mesófilas totais (aeróbias)

Retirar 5 ml da amostra preparada, distribuindo-as em 5 placas de Petri. Em seguida, adicionar o meio de cultura glicose-triptona-ágar. Após homogeneizar e solidificar, proceder à incubação das placas de Petri por 72 horas a 30°C. Após esse período, realizar as contagens das colônias produtoras de ácido, expressando o resultado total em UFC de mesófilos/g de açúcar.



Figura 7.5: Colônias de bactérias mesófilas aeróbias
 Fonte: Godoy, 2005

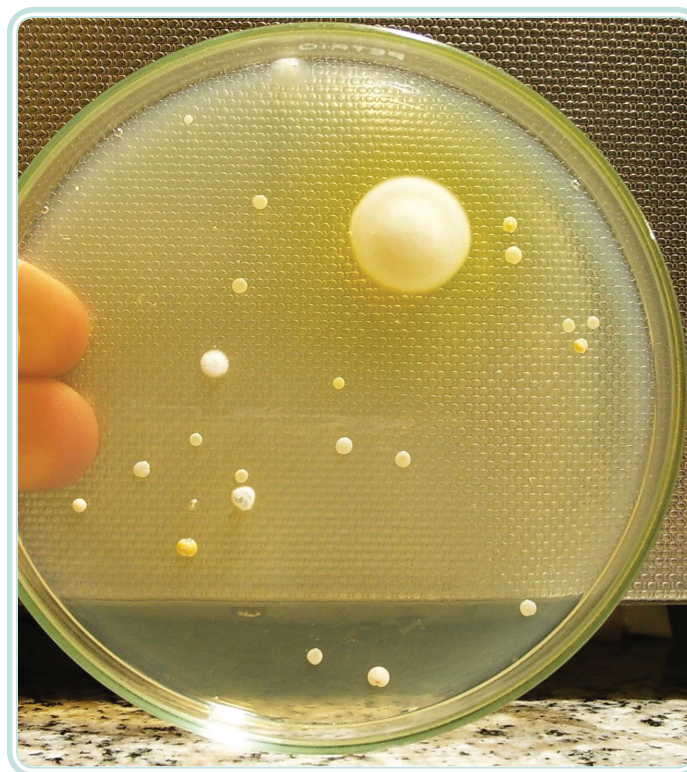


Figura 7.6: Colônias de bactérias mesófilas aeróbias
 Fonte: <http://www.airelimpioilimitado.net/page/lema.html>

7.3.2 Contagem de bolores e leveduras

Seguindo o mesmo procedimento anterior, distribuir volumes de 5 ml da amostra em 5 placas de Petri e sobre as mesmas adicionar o meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar), acidificado com pH 3,5. Após homogeneizar e solidificar, incubar por um período de 4 a 5 dias a 30°C. Em seguida, realizar as contagens de colônias de leveduras e de bolores e expressar os resultados UFC de leveduras e bolores/g de açúcar.

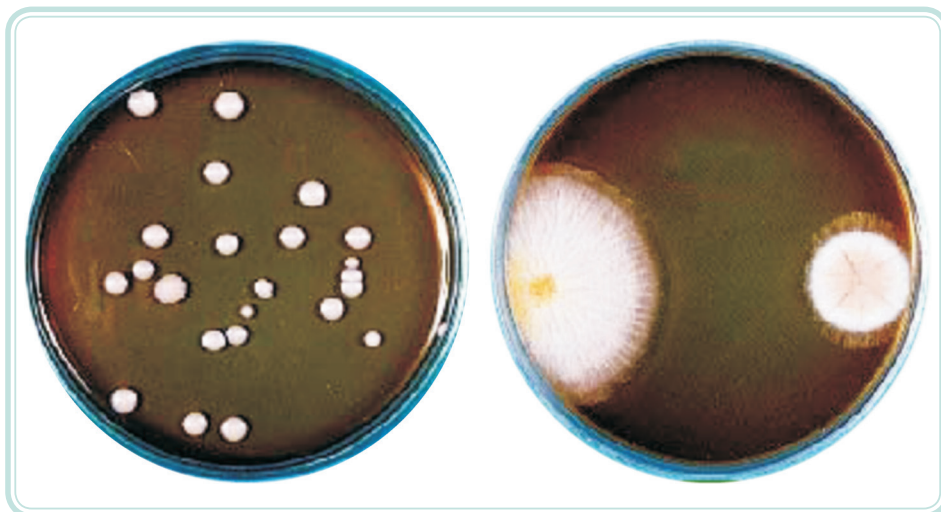


Figura 7.7: Colônias de leveduras e bolores

Fonte: Godoy, 2005

7.3.3 Bactérias termófilas esporuladas

As amostras para contagem de bactérias termófilas esporuladas devem ser submetidas primeiramente a choque térmico, levando-as à ebulição por 5 minutos e em seguida resfriando com água.

7.3.3.1 Contagem de esporos de bactérias termófilas anaeróbias totais e “flat-sour” (acidez plana)

Após o choque térmico, distribuir 2 ml da amostra em cada uma das 5 placas de Petri. Em seguida adicionar o meio de cultura (glicose-triptona-ágar), homogeneizar, solidificar e incubar em estufa à temperatura de 55°C por 48 horas. As colônias de bactérias produtoras de “flat-sour” são circundadas por um halo amarelo, que pode desaparecer após a retirada das placas da estufa. Por isso, proceder a contagem logo após a retirada e expressar o resultado em número de esporos termófilos “flat-sour” por 10 gramas de açúcar, multiplicando o total por 5.

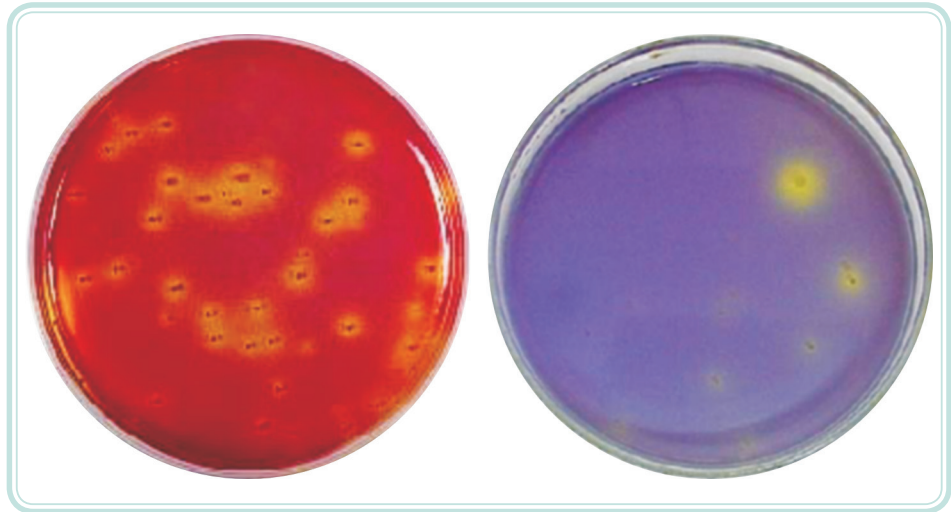


Figura 7.8: Colônias de bactérias produtoras de “flat-sour”

Fonte: Godoy, 2005

7.3.3.2 Contagem de esporos de bactérias termófilas anaeróbias produtoras de gás (não produtores de H₂S)

Após choque térmico, distribuir 20 ml em 6 tubos de ensaios (3,3 ml/tubo) contendo 20 ml do meio de fígado (*Liver Broth*) aquecidos a 55°C. Vedar os tubos com uma camada de parafina, mergulhando os tubos em água para solidificar. Incubá-los em anaerobiose a 55°C por 72 horas. Após esse período, realizar as contagens dos tubos positivos, isto é, aqueles que apresentarem deslocamento da parafina para cima, indicando o crescimento das bactérias termófilas presentes. Os resultados desse teste são apenas qualitativos, não podendo ser expressos em números.

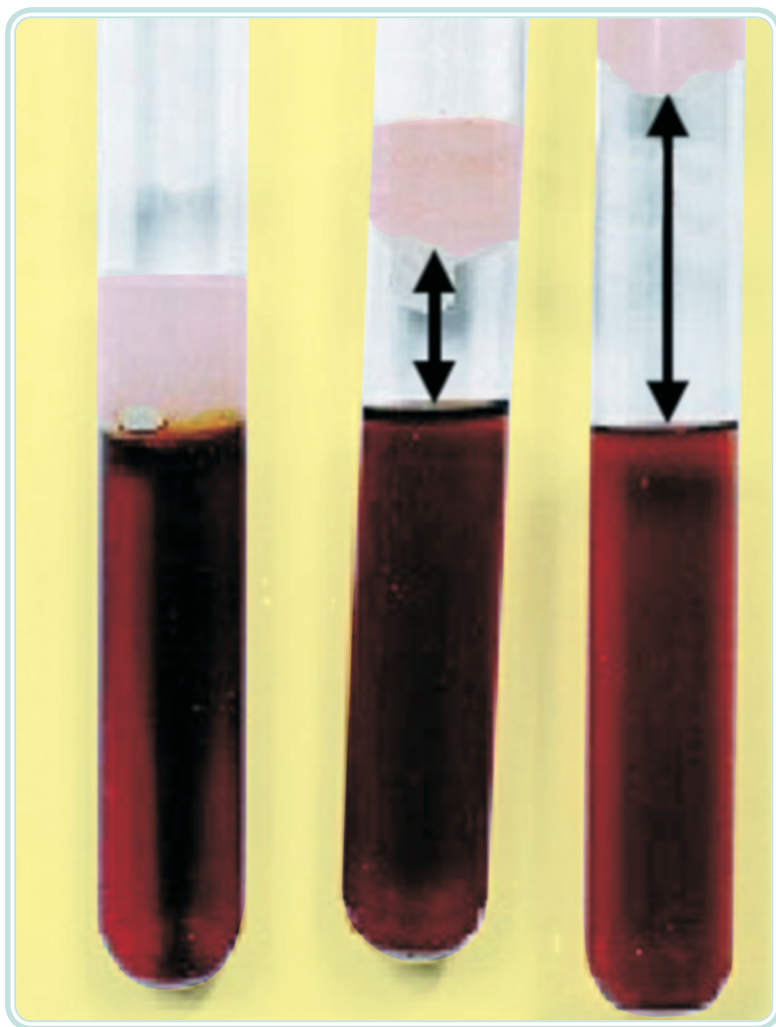


Figura 7.9: Termófilos anaeróbios produtores de gás (não produtores de H₂S)

Fonte: Godoy, 2005

7.3.3.3 Contagem de esporos de bactérias termófilas anaeróbias produtoras de H₂S

Para a determinação de esporos anaeróbios termófilos produtores de ácido sulfúrico, distribuir 20 ml da amostra, submetida ao choque térmico, em 6 tubos de ensaio (3,3 ml/tubo) contendo o meio ágar-sulfito, previamente exaustados, ou seja, aquecidos a 55°C. Colocar a amostra de 3,3 ml abaixo da superfície do meio, agitar suavemente, em seguida, evitando-se a introdução de ar. Após solidificar, incubar os tubos a 55°C por 48 horas. As colônias de deterioração sulfídrica são negras. Realizar as contagens nos 6 tubos e expressar o resultado como número de esporos por 10 gramas de açúcar.

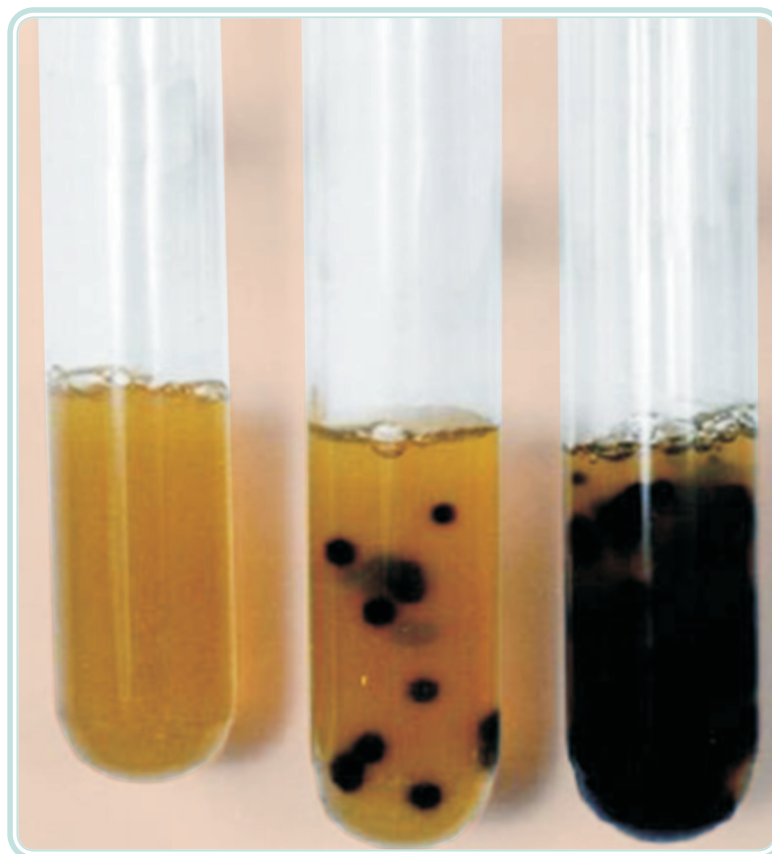


Figura 7.10: Termófilos anaeróbios produtores de H₂S

Fonte: Godoy, 2005

7.3.4 Contagem de coliformes totais e fecais

Dissolver 10 g de açúcar em 90 ml de água destilada esterilizada. Preparar 9 tubos de ensaio com 10 ml do meio de caldo lactosado em cada tubo, com tubo de Durham: 3 (grandes) em concentração dupla e 6 (médios) com concentração simples. Autoclavar à 121°C por 15 minutos. Em seguida, nos tubos com concentração dupla inocular 10 ml da amostra, nos 3 primeiros de concentração simples 1 ml e nos 3 últimos 0,1 ml. Após 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, proceder o teste confirmativo nos tubos que apresentarem resultados positivos (presença de gases no tubo de Durham). Com a alça de platina, repicar cada tubo positivo para tubos com 5 ml de caldo Verde Brilhante 2% e tubos com 5 ml de meio EC. Incubar o meio Verde Brilhante 2% por 24-48 horas à temperatura de 37°C, enquanto o EC por 24 horas à temperatura de 45°C. O meio de cultura Verde Brilhante 2% é usado como teste confirmativo para presença de coliformes totais e o meio EC para bactérias do grupo dos coliformes fecais (*Escherichia coli*). Se ocorrer produção de gás (fermentação), indica presença de coliformes totais e fecais, respectivamente.

7.4 Padrões internacionais para o controle microbiológico do açúcar

Veja na Tabela 7.1 os padrões internacionais exigidos para controle microbiológico do açúcar.

Tabela 7.1: Controle microbiológico do açúcar						
Exigido por	Mesófilas	Leveduras e bolores	Termófilas			<i>Salmonella</i> sp
			Flat-sour	H ₂ S (+)	H ₂ S (-)	
National Canners Association	50 UFC/g	50 UFC/g	50 esp/10 g	5 esp/10 g	< 65% dos tubos (+)	ausente/ 25 g
Natinal Soft-Drinks Association	200 UFC/10 g	10 UFC/10 g				
ICUMSA	200 UFC/10 g	20 UFC/10 g	50 esp/10 g	5 esp/10 g	< 65% dos tubos (+)	
Coca-Cola Internacional	200 UFC/10 g	10 UFC/10 g				

Fonte: Amorim, 2000

Resumo

Vimos nesta aula sobre os principais microrganismos contaminantes do açúcar. Entre eles estão bactérias, fungos e leveduras, cujo monitoramento e detecção são de grande importância para a manutenção da qualidade do produto. As medidas de qualidade devem ser implantadas em todas as etapas de processamento do açúcar, a fim de minimizar os problemas e proporcionar a fabricação de produtos que atendam aos padrões internacionais de qualidade. Para isso aprendemos as principais características dos contaminantes e as análises microbiológicas respectivas para o devido controle.

Atividades de aprendizagem

1. Preencha as lacunas de acordo com as características dos principais contaminantes do açúcar:
 - a) Bactérias de deterioração sulfídrica.
 - b) Termófilas produtoras de gás.
 - c) Bactérias produtoras "flat-sour".



d) *Salmonellas*.

e) *Staphylococcus aureus*.

f) Mesófilos aeróbios totais.

() Elas promovem a acidificação dos produtos, por meio da redução do pH, sem haver produção de gás.

() São enterobactérias, Gram-negativas, não esporuladas. Também fazem parte das enterobactérias patogênicas.

() São bastonetes Gram-positivos, esporulados aeróbios e anaeróbios facultativos, representados especialmente por bactérias do gênero *Bacillus*.

() Bactérias Gram-positivas, encontrados em cavidades nasais, garganta e trato intestinal.

() São bactérias que promovem deterioração em alimentos enlatados de baixa acidez, com odor característico semelhante a ovo podre.

() A espécie mais importante é *Clostridium thermosaccharolyticum*.

2. Por que deve ser feito o controle microbiológico do açúcar?

3. Como podem ser caracterizadas as colônias de bactérias produtoras de "flat-sour"?

4. Na contagem de esporos de bactérias não produtoras de H_2S , qual a função da parafina? Explique.

Referências

ALQUATI, P. H. **Caracterização e controle de microorganismos contaminantes em microdestilaria de álcool**. Disponível em: <<http://www.liberato.com.br/upload/arquivos/0131010712534512.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2009.

AMORIM, H. V. **Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica: Microscopia**. Piracicaba: Fermentec S/C LTDA, 2000.

AMORIM, H. V. **Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica: Plaqueamento**. Piracicaba: Fermentec S/C LTDA, 2000.

AMORIM, H. V. **Controle microbiológico do açúcar**. Piracicaba: Fermentec S/C LTDA, 2000.

ANDRIETTA, M. da G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. **Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda**. Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais, São Paulo, v. 7, out. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_02_7.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2010.

ANGELIS, D. F. **Controle microbiológico nas usinas de açúcar e álcool**. São Paulo: Instituto de Biociências Campus de Rio Claro, Unesp. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Controle20microbiologico%20nas%20usinas%20de%20acucar20e20alcool.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2010.

ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação etanólica**. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2010.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análise e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Araras: UFSCar, 2004. 33 p. (Apostila).

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. V. 1. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, J. R. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **Revista STAB**, São Paulo, v. 23, n. 5, maio/jun. 2005.

CIBIM, I. L. et al. **Manual para análises microbiológicas em usinas de açúcar e álcool**. Piracicaba: STAB, 1996.

FARIA, A. P. O. da C. **Treinamento básico em microbiologia**. São Paulo: Química Real/Elanco, 2005.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, São Paulo, 1989.

GODOY, A. **Excelência na produção de açúcar de qualidade**. Piracicaba: Fermentec S/C LTDA, 2005. CD-ROM.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. v. 3. São Paulo: Editora Blücher LTDA, 2001.

MELLO, G. **Manual de microbiologia**. v 1. São Paulo: Elanco, 2004.

MOREIRA, A. L. et al. Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n.1, p.35-42, jan./jun. 2008.

NOBRE, T. de P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. **Viabilidade celular de *saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

OLIVEIRA, A. S. de. Controle do processo fermentativo para a produção de álcool em microdestilaria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 9, n. 4, 2009. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/2679/2329>>. Acesso em: 10 mai. 2010.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química da Unicamp. Campinas, São Paulo, 2001.

STROPPIA, C. T. **Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Campinas, São Paulo, 1998.

Currículo do professor-autor

Darlene Ana de Paula Vieira é Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás – IFGoiás, atuando na área biológica. Formada em biologia pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (1998), com mestrado em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (2006). Acumulou experiência profissional de mais de 14 anos na área de educação, iniciou as suas atividades profissionais em 1994, como professora da rede estadual de educação.



Nayara Cláudia de Assunção Queiroz Fernandes atua como Técnica em Laboratório de Ciências no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Goiás (2005), com especialização em Ciências Biológicas pelas Faculdades Integradas de Jacarepaguá (2009). Acumulou experiência profissional na área de Farmácia Clínica, com aperfeiçoamento em Farmacologia Clínica pelo Instituto de Ensino Ethosfarma (2006).



