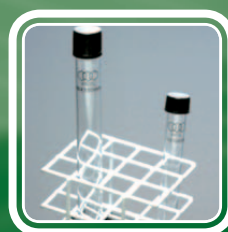




Técnico em Agroindústria

Andressa Carolina Jacques

Microbiologia



INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
SUL-RIO-GRANDENSE
Campus Pelotas

UFRN
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Ministério da
Educação

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA



Microbiologia

Andressa Carolina Jacques



**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
SUL-RIO-GRANDENSE**
Campus Pelotas

**PELOTAS
2013**

© Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul-Rio-Grandense (IFSul).

Este Caderno foi elaborado em parceria entre o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul-Rio-Grandense (IFSul) e a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) para a Rede e-Tec Brasil.

Reitor do IF Sul-Riograndense

Prof. Antônio Carlos Barum Brod – IFSUL

Diretor-Geral do Campus Pelotas

Prof. José Carlos Pereira Nogueira – IFSUL

Equipe de Elaboração

Instituto Federal Sul-Rio-Grandense – IFSUL

Coordenadora Geral

Profa. Cíara Ourique Nascimento – IFSUL

Coordenador Adjunto

Prof. Ricardo Lemos Sainz – IFSUL

Coordenador de Curso

Prof. Marcelo Zaffalon Peter – IFSUL

Apoio Técnico

Profa. Maria Isabel Giuste Moreira – IFSUL

Professor-Autor

Prof. Leandro da Conceição Oliveira – IFSUL

Equipe de Produção

Secretaria de Educação a Distância / UFRN

Reitora

Profa. Ângela Maria Paiva Cruz

Vice-Reitora

Profa. Maria de Fátima Freire Melo Xímenes

Secretária de Educação a Distância

Profa. Maria Carmem Freire Diógenes Rêgo

Secretária Adjunta de Educação a Distância

Profa. Ione Rodrigues Diniz Morais

Coordenador de Produção de Materiais Didáticos

Prof. Marcos Aurélio Felipe

Revisão

Camila Maria Gomes

Janio Gustavo Barbosa

Juliane Patrícia da Silva Santana Cavalcante

Orlando Brandão Meza Ucella

Priscila Xavier de Macedo

Verônica Pinheiro da Silva

Diagramação

José Antonio Bezerra Junior

Luciana Melo de Lacerda

Arte e Ilustração

Amanda Duarte

Revisão Tipográfica

Letícia Torres

Projeto Gráfico

e-Tec/MEC

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - IFSUL



Apresentação e-Tec Brasil

Prezado estudante,

Bem-vindo a Rede e-Tec Brasil!

Você faz parte de uma rede nacional de ensino, que por sua vez constitui uma das ações do Pronatec - Programa Nacional de Acesso ao Ensino Técnico e Emprego. O Pronatec, instituído pela Lei nº 12.513/2011, tem como objetivo principal expandir, interiorizar e democratizar a oferta de cursos de Educação Profissional e Tecnológica (EPT) para a população brasileira propiciando caminho de acesso mais rápido ao emprego.

É neste âmbito que as ações da Rede e-Tec Brasil promovem a parceria entre a Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica (SETEC) e as instâncias promotoras de ensino técnico como os Institutos Federais, as Secretarias de Educação dos Estados, as Universidades, as Escolas e Colégios Tecnológicos e o Sistema S.

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 promover o fortalecimento da formação de jovens moradores de regiões distantes, geográfica ou economicamente, dos grandes centros.

A Rede e-Tec Brasil leva diversos cursos técnicos a todas as regiões do país, incentivando os estudantes a concluir o ensino médio e realizar uma formação e atualização contínuas. Os cursos são ofertados pelas instituições de educação profissional e o atendimento ao estudante é realizado tanto nas sedes das instituições quanto em suas unidades remotas, os polos.

Os parceiros da Rede e-Tec Brasil acreditam em uma educação profissional qualificada – integradora do ensino médio e educação técnica, - que 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
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: remete o tema para outras fontes: livros, filmes, músicas, *sites*, programas de TV.



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 – Classificação dos microrganismos	15
1.1 Seres vivos.....	15
1.2 Células microbianas.....	17
1.3 Organismos procarióticos e eucarióticos.....	18
1.4 Classificação dos reinos vivos	20
Aula 2 – Morfologia e fisiologia das bactérias, fungos e vírus	25
2.1 Bactérias.....	25
2.2. Estrutura bacteriana.....	27
2.3 Reprodução.....	31
2.4 Fungos.....	33
2.5 Reprodução.....	34
2.6 Classificação dos fungos.....	35
2.7 Vírus.....	36
2.8 Estrutura dos vírus.....	37
Aula 3 – Crescimentos dos microrganismos	39
3.1 Curva de crescimento dos microrganismos.....	39
3.2 Tempo de duplicação.....	39
3.3 Fases da curva de crescimento dos microrganismos.....	40
3.4 Fatores que regulam o crescimento dos microrganismos.....	41

Aula 4 – Doenças de origem alimentar, infecções e intoxicações alimentares	49
4.1 Perigos de contaminação em alimentos.....	49
4.2 Infecções e toxifencções alimentares.....	51
Aula 5 – Segurança do trabalho e de higiene em laboratório de microbiologia	59
5.1 Normas de segurança do trabalho aplicado à microbiologia.....	59
5.2 Preparação de material de laboratório para análises microbiológicas.....	61
5.3 Preparação de amostra para análises microbiológicas.....	67
Aula 6 – Análises microbiológicas	71
6.1 Análises microbiológicas.....	71
6.2 Contagem Padrão em Placas (CPP)	72
6.3 Método do Número Mais Provável (NMP).....	75
6.4 Técnica da redução de corantes para estimar o número de células viáveis, as quais possuem capacidade de redução.....	76
6.5 Contagem por Microscopia Direta (CMD) tanto para células viáveis como não viáveis.....	77

Palavra do professor-autor

Caro aluno, o universo dos microrganismos é fascinante! Com esta disciplina, você poderá entender o papel básico dos microrganismos, tendo condições de diferenciá-los e prevenir sua multiplicação. Você também poderá ter noções sobre as principais doenças de origem alimentar e suas formas de prevenção, assim como as principais análises aplicadas à Microbiologia de Alimentos. O conteúdo abordado lhe deixará estimulado a conhecer ainda mais esse universo. Seja bem-vindo!

Apresentação da disciplina

Na Aula 1, identificaremos as principais células microbianas, assim como diferenciaremos organismos eucarióticos de procarióticos. Nesta aula, também identificaremos os Reinos Vivos.

Na Aula 2, aprenderemos a diferenciar as bactérias dos fungos e vírus quanto a sua morfologia e fisiologia e modo de reprodução.

Na Aula 3, identificaremos as fases de crescimento dos microrganismos e diferenciaremos os fatores que regulam o seu crescimento.

Na Aula 4, vimos quais são os principais perigos de contaminação e seus veículos de transmissão em alimentos, assim como analisaremos os surtos por contaminação alimentar. Também listaremos as principais infecções e intoxicações alimentares

Na Aula 5, identificaremos os métodos de preparo de material e amostras para as análises microbiológicas, assim como descreveremos sobre os processos de esterilização de materiais e preparação de meios de cultura. Também reconheceremos a importância das normas de segurança e higiene em análises microbiológicas e utilização dos equipamentos de proteção individual.

Na Aula 6, identificaremos os princípios básicos dos principais métodos de análises microbiológicas.

Projeto instrucional

Disciplina: Microbiologia (carga horária total: 75h)

Ementa: Desenvolve conteúdos que envolvem conhecimentos sobre a morfologia e fisiologia dos microrganismos nos alimentos. Trabalha conceitos e características de toxinfecções e doenças vinculadas aos alimentos e promove estudos sobre segurança e higiene vinculados à microbiologia tanto em relação aos produtos alimentares como aos não alimentares que se integram no processamento tecnológico da agroindústria.

AULAS	OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM	CARGA HORÁRIA (HORAS)
Aula 1. Classificação dos microrganismos	Identificar e diferenciar as características gerais das principais células microbianas. Diferenciar os organismos eucarióticos de procarióticos. Diferenciar os Reinos Vivos.	05
Aula 2. Morfologia e fisiologia das bactérias, fungos e vírus	Diferenciar as bactérias, fungos e vírus quanto a sua morfologia e fisiologia e modo de reprodução.	15
Aula 3. Crescimentos dos microrganismos	Descrever as fases de crescimento dos microrganismos e diferenciar os fatores que regulam o crescimento deles.	10
Aula 4. Doenças de origem alimentar; infecções e intoxicações alimentares	Identificar os principais perigos de contaminação e seus veículos de transmissão. Analisar os surtos por contaminação alimentar, exemplificando-os. Diferenciar infecções de intoxicações alimentares.	15
Aula 5. Segurança do trabalho e de higiene em laboratório de microbiologia	Reconhecer a importância das normas de segurança e higiene em análises microbiológicas. Reconhecer e utilizar corretamente os equipamentos de proteção individual. Listar os métodos de preparo de material e amostras para as análises microbiológicas.	15
Aula 6. Análises microbiológicas	Identificar os princípios básicos dos principais métodos de análises microbiológicas.	15

Aula 1 – Classificação dos microrganismos

Objetivos

Identificar e diferenciar as características gerais das principais células microbianas.

Diferenciar os organismos eucarióticos de procarióticos.

Diferenciar os reinos vivos.

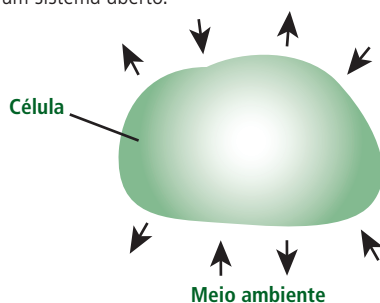
1.1 Seres vivos

Quais as características essenciais dos seres vivos? O que diferencia as células dos objetos inanimados? Nosso conceito do que é vivo restringe-se ao que podemos atualmente observar na Terra ou ao que podemos deduzir a partir de registros fósseis. Entretanto a partir de conhecimentos biológicos, acumulados até hoje, podemos identificar várias características comuns à maioria dos seres vivos, as quais se encontram resumidas a seguir: (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003).

1- COMPARTIMENTALIZAÇÃO E METABOLISMO

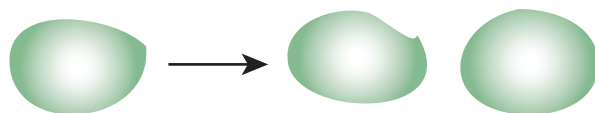
As células captam os nutrientes a partir do meio ambiente, realizam sua transformação e eliminam os produtos de excreção no meio.

Portanto,
a célula é um sistema aberto.



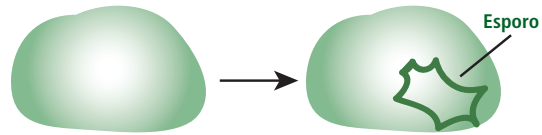
2- REPRODUÇÃO (CRESCIMENTO)

Os compostos químicos captados do meio ambiente são transformados em novas células sob o controle genético das células preexistentes.



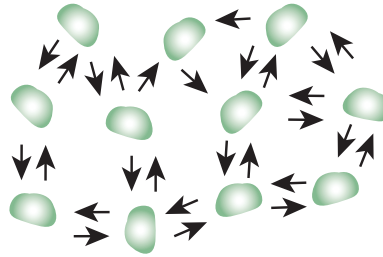
3- DIFERENCIAÇÃO

Algumas células podem formar novas estruturas celulares, como um esporo, normalmente como parte de um ciclo de vida celular.



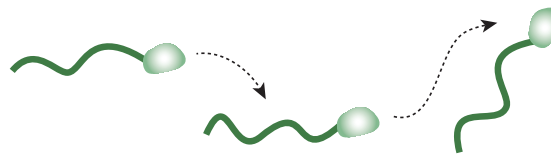
4- COMUNICAÇÃO

As células comunicam-se ou interagem por meio de compostos químicos que são liberados ou captados



5- MOVIMENTAÇÃO

Algumas células são capazes de realizar a autopropulsão.



6- EVOLUÇÃO

As células contêm genes e evoluem de forma a apresentar novas propriedades biológicas. As árvores filogenéticas revelam as relações evolutivas entre as células.

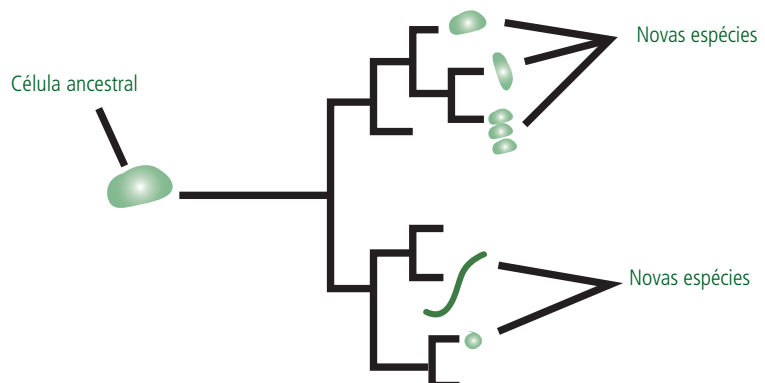


Figura 1.1: Marcos da vida celular

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: MADIGAN, MARTINKO E PARKER (2003).

A diferenciação e a motilidade não são propriedades de todas as células microbianas.



1.2 Células microbianas

A célula corresponde à unidade fundamental do ser vivo. Uma única célula corresponde a uma entidade, separada das outras células por uma membrana (e, em algumas vezes, por uma parede celular), contendo uma variedade de compostos químicos e estruturas subcelulares em seu interior. (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003).

A **membrana celular** corresponde a uma barreira que separa o interior da célula do meio externo. Internamente à membrana celular, encontram-se várias estruturas e compostos químicos que permitem o funcionamento celular (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003). Em algumas células, essa região é representada por uma estrutura denominada **núcleo**, circundada pela membrana celular. Em células mais simples, existe um material similar, porém esse não é separado fisicamente do restante da célula por uma membrana. Neste caso, a região é referida como **nucleoide** (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009). O núcleo ou nucleoide contém a informação genética necessária à formação das novas células. Há também o **citoplasma**, onde encontramos a maquinaria responsável pelo crescimento e funcionamento celular. (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003).

Em um organismo unicelular (constituído por uma única célula), todos os processos vitais ocorrem dentro da célula. Se um organismo possui muitas células ele é multicelular. Em forma de vida superior, como plantas e animais, essas células estão arranjadas em estruturas chamadas de tecidos ou órgãos com funções específicas. Todos os organismos unicelulares e multicelulares apresentam as seguintes características: (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

- Reprodução.
- Utilização de alimento como fonte de energia.
- Síntese de substâncias e estruturas celulares.
- Excreção de substâncias.
- Resposta a alterações ambientais.

1.3 Organismos procarióticos e eucarióticos

Agora que já estudamos as principais características dos seres vivos e já percebemos que a célula é a unidade fundamental do ser vivo, iremos estudar os tipos de organismos.

Os avanços da microscopia eletrônica levaram a melhor visualização da estrutura celular interna, podendo, assim, dividir as células microbianas em duas categorias: as células eucarióticas possuem um núcleo separado do citoplasma por uma membrana nuclear, enquanto as células procarióticas apresentam material nuclear sem membrana, sendo essa a principal diferença.

1.3.1 Organismos procarióticos

As células procariontes possuem aspecto granuloso, mas bastante uniforme, sendo as células eucariontes bem mais complexas por causa de sua organização estrutural, dividindo-se em diferentes compartimentos.

As células procariontes contêm algumas estruturas internas chamadas organelas, bem diferentes das células eucariontes, sendo que as procariontes não são delimitadas por membranas lipídicas. Por exemplo, o DNA em uma célula procarionte ocupa uma região de forma irregular chamada nucleóide. Em contraste, o DNA de uma célula eucarionte localiza-se em núcleo bem definido delimitado por membrana (INGRAHAM; INGRAHAM; 2010).

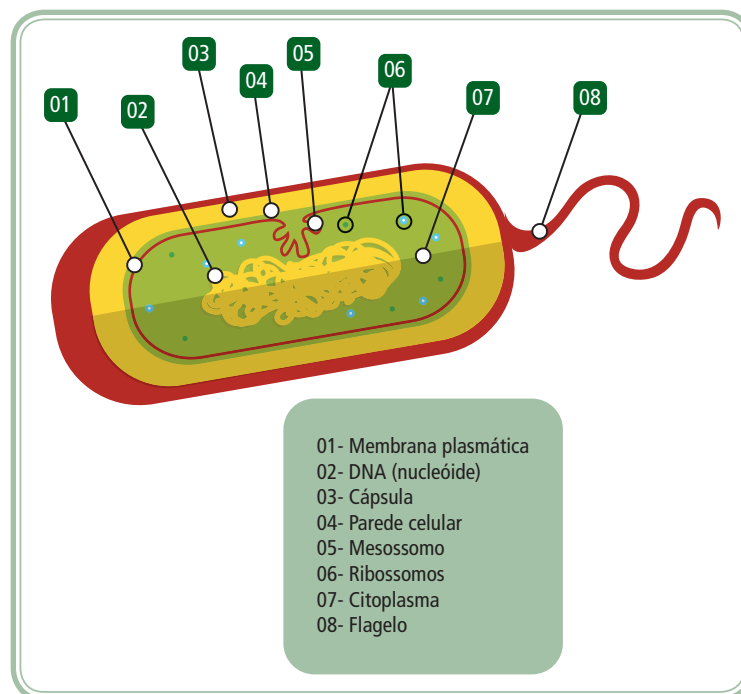


Figura 1.2: Estrutura típica de uma célula procariótica

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Prokaryote_cell_diagram_pt.svg>. Acesso em: 22 ago. 2012.

1.3.2 Organismos eucarióticos

Todas as células, exceto as bactérias e arqueas, são eucariontes. Logo, as células de algas, protozoários e fungos são semelhantes, em estrutura, às células humanas. Diferentemente das células procariontes, que são uniformemente granuladas sob o microscópio eletrônico, as células eucariontes se subdividem em muitos compartimentos, cada um deles ligados a uma membrana unitária (INGRAHAM & INGRAHAM; 2011)

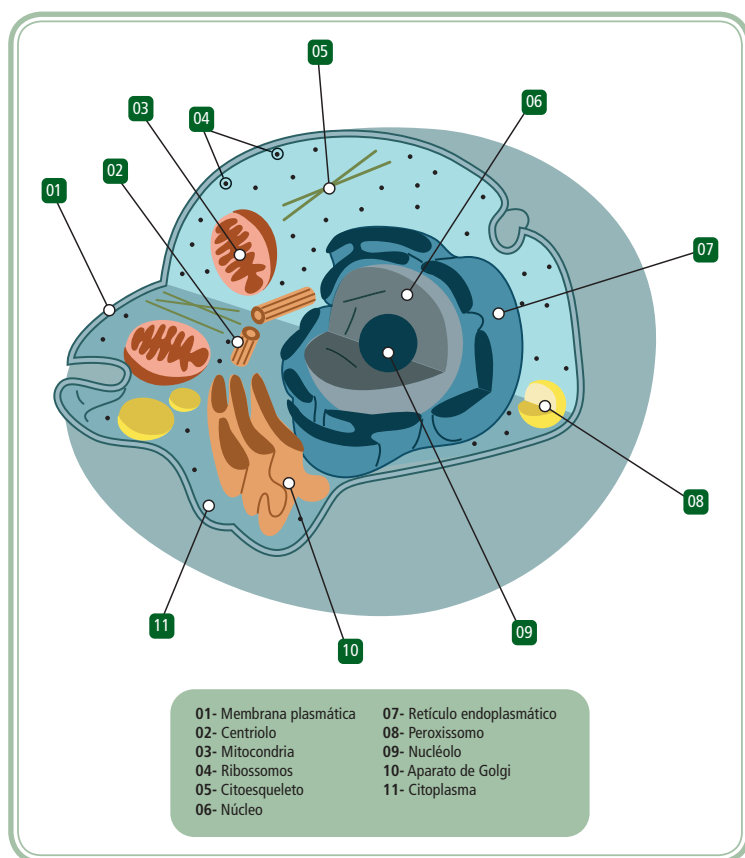


Figura 1.3: Estrutura típica de uma célula eucariótica

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <<http://www.mundovestibular.com.br/artigos/214/1/CELULAANIMAL/Paacutegina1.html>>. Acesso em: 22 ago. 2012

Arqueas são seres geralmente encontrados em ambientes extremos (salinidade, temperatura, pH etc.) e são diferente das bactérias, já que diversas arqueas não têm parede celular. Também diferem das bactérias com relação a organização e funcionamento dos genes: arqueas têm organização e ação gênica mais semelhante às dos organismos eucarióticos e as bactérias com organização e ação gênica distintas.





1. Defina célula.
2. O que é membrana celular e qual sua principal função?
3. Quais as principais características dos organismos unicelulares e pluricelulares?
4. Diferencie núcleo de nucleóide.

1.4 Classificação dos reinos vivos

Em relação à classificação e distribuição dos seres vivos, utilizaremos o sistema dos cinco reinos, de acordo com a proposta de Robert Whittaker (1920: 1980), baseada no tipo de célula, no nível de organização celular e no tipo de nutrição.

1. Monera: procariontes unicelulares, autótrofos e heterótrofos.
2. Protista: eucariontes unicelulares e pluricelulares, autótrofos e heterótrofos.
3. Fungi: eucariontes unicelulares e pluricelulares; heterótrofos.
4. Plantae: eucariontes pluricelulares, autótrofos.
5. Animalia: eucariontes pluricelulares, heterótrofos.



Autótrofos: são os seres vivos, como plantas e as algas, que realizam a sua nutrição por meio da fotossíntese.

Heterótrofos: são os seres vivos que buscam energia se alimentando de outros seres vivos, pois são incapazes de produzir energia sozinhos (por meio da fotossíntese).

Observe a figura a seguir:

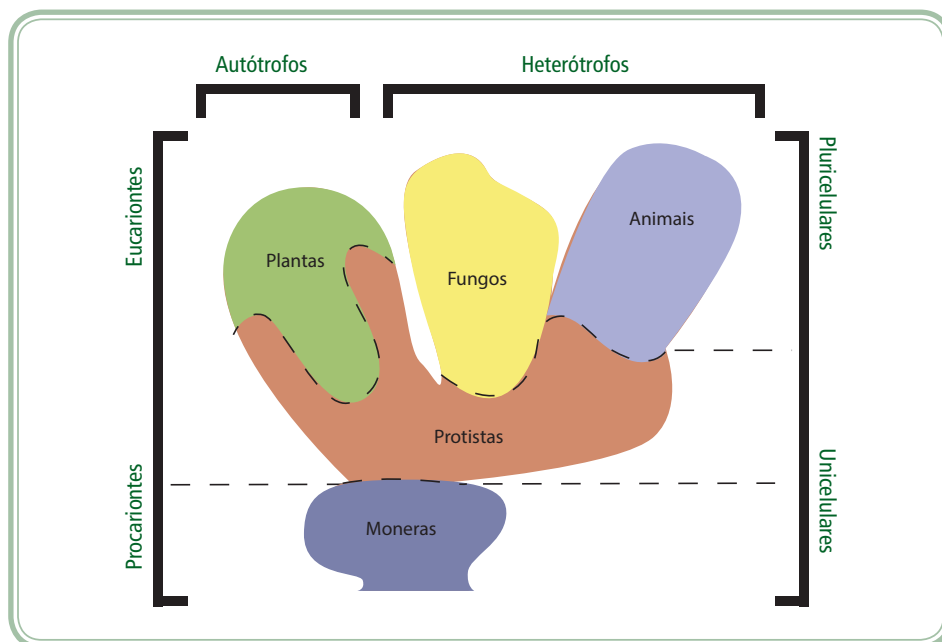


Figura 1.4: Divisão dos cinco reinos, de acordo com Robert H. Whittaker (1969)

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: SANTOS, et al. (2007)

Nesse esquema de classificação, os procariotos constituem o **reino Monera**, sendo que eles, normalmente, obtêm nutrientes somente por absorção e não podem ingerir alimentos ou realizar fotossíntese (como as plantas).

O **reino Protista** inclui os microrganismos eucarióticos unicelulares, que apresentam os três tipos nutricionais: as algas são fotossintéticas, os protozoários podem ingerir seu alimento e os fungos limosos (fungos inferiores) somente absorvem os nutrientes. Os organismos eucarióticos superiores são colocados no **reino Plantae** (plantas verdes fotossintéticas e algas superiores), **Animalia** (animais que ingerem alimentos) e **Fungi**, organismos que têm parede celular, mas não apresentam o pigmento fotossintético clorofila encontrado em outras plantas, portanto, eles absorvem os nutrientes. Assim, os microrganismos foram colocados em três dos cinco reinos: Monera (bactérias), Protista (protozoários e algas microscópicas) e Fungi (bolores e leveduras) (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).



1. Analise as figuras a seguir e as separe em dois grupos.



2. Tendo os dois grupos formados, separe novamente as figuras em quatro grupos.

3. Agora, tente separar as figuras formando mais de quatro grupos.

Para discutir:

Para separar os grupos, você usou algum critério? Qual? Por quê?

Foi fácil separá-los em dois grupos? E em quatro grupos? E em mais de quatro grupos?

O que é classificar?

Qual a importância de um sistema de classificação?

Com atividades como essa, você pode verificar que, ao longo da história, o homem aprendeu que a prática de classificar seres e objetos facilita a manipulação, além de permitir que seu estudo seja compartilhado entre pessoas, constituindo um eficiente método de comunicação.

Resumo

Nesta aula, você aprendeu a identificar e diferenciar as principais características das células microbianas, assim como também já sabe diferenciar uma célula procariótica de uma eucariótica. Também foi visto nesta aula que os reinos vivos se dividem em cinco, de acordo com Whittaker, em 1969.

Atividade de aprendizagem

1. Diferencie organismo unicelular de pluricelular.
2. Diferencie organismo eucariótico de procariótico.
3. Cite os cinco reinos e diferencie-os.
4. Dê exemplo de cada reino vivo.

Aula 2 – Morfologia e fisiologia das bactérias, fungos e vírus

Objetivo

Diferenciar as bactérias, fungos e vírus quanto a sua morfologia e fisiologia e modo de reprodução.

2.1 Bactérias

Depois de termos visto na última aula as principais características das células microbianas, vamos agora falar sobre as bactérias, que, como você já sabe, fazem parte do reino Protista.

2.1.1 Morfologia

Vamos, então, começar nosso estudo falando sobre o tamanho das bactérias. Você já parou pra pensar qual o tamanho de uma bactéria? Bem, na verdade, elas são invisíveis ao olho humano, sendo normalmente medidas em micrômetro (μm), que são equivalentes a 1/1000 mm.

As células bacterianas variam de tamanho dependendo da espécie, mas a maioria tem, aproximadamente, de 0,5 a 1 μm em diâmetro ou largura (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

É difícil imaginar o tamanho diminuto da bactéria. Os cálculos mostram que, aproximadamente, 1 trilhão de células bacterianas pesariam somente um grama. As bactérias são, comumente, vistas pelo microscópio em uma magnitude de 1000 vezes (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

Na última década, a generalização quanto ao tamanho das bactérias foi quebrada com a descoberta de uma bactéria no intestino de um peixe tropical chamada *Epulopiscium fishelsoni*, com cerca de 600 μm de comprimento e 80 μm de espessura, facilmente visível ao olho nu.

A velocidade com que os nutrientes e produtos de excreção entram e saem de uma célula é inversamente proporcional ao seu tamanho, podendo afetar sobremaneira as taxas metabólicas e de crescimento. Alguns



A-Z

Biofilmes

São agregações complexas das bactérias, que criam uma barreira de proteção contra qualquer tentativa de exterminá-las. Os biofilmes formam-se em qualquer situação onde haja contato de sólidos e líquidos ou sólidos e gases – ou seja, em praticamente todos os lugares imagináveis.

microbiologistas propuseram a existência de bactérias extremamente pequenas na natureza, denominadas *nanobactérias*. A maioria dos relatos sobre as *nanobactérias* sugere a formação de **biofilmes** em diversos ambientes, como a superfície de minerais e tecidos humanos (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003).

2.1.2 Forma e arranjo

Depois de sabermos o tamanho aproximado de uma bactéria, agora vamos saber que tipo de forma e o arranjo que essa bactéria pode apresentar.

Devemos entender que nem todas as bactérias são iguais, sendo que as células bacterianas individuais apresentam uma das três formas básicas: esféricas, cilíndricas ou espiraladas. As células esféricas são chamadas de **cocos**. São, geralmente, arredondadas, mas podem ser ovóides ou achatadas em um dos lados, quando estão aderidas a outra célula. As células cilíndricas ou em forma de bastão são chamadas de **bacilos**. Existem diferenças consideráveis em comprimento e largura entre as várias espécies de bacilos. As bactérias espiraladas ou helicoidais assemelham-se a um saca-rolhas e são chamadas de **espirilos**.

Enquanto as bactérias espiraladas, normalmente, aparecem como células únicas, outras espécies de bactérias podem crescer em arranjos ou padrões característicos (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

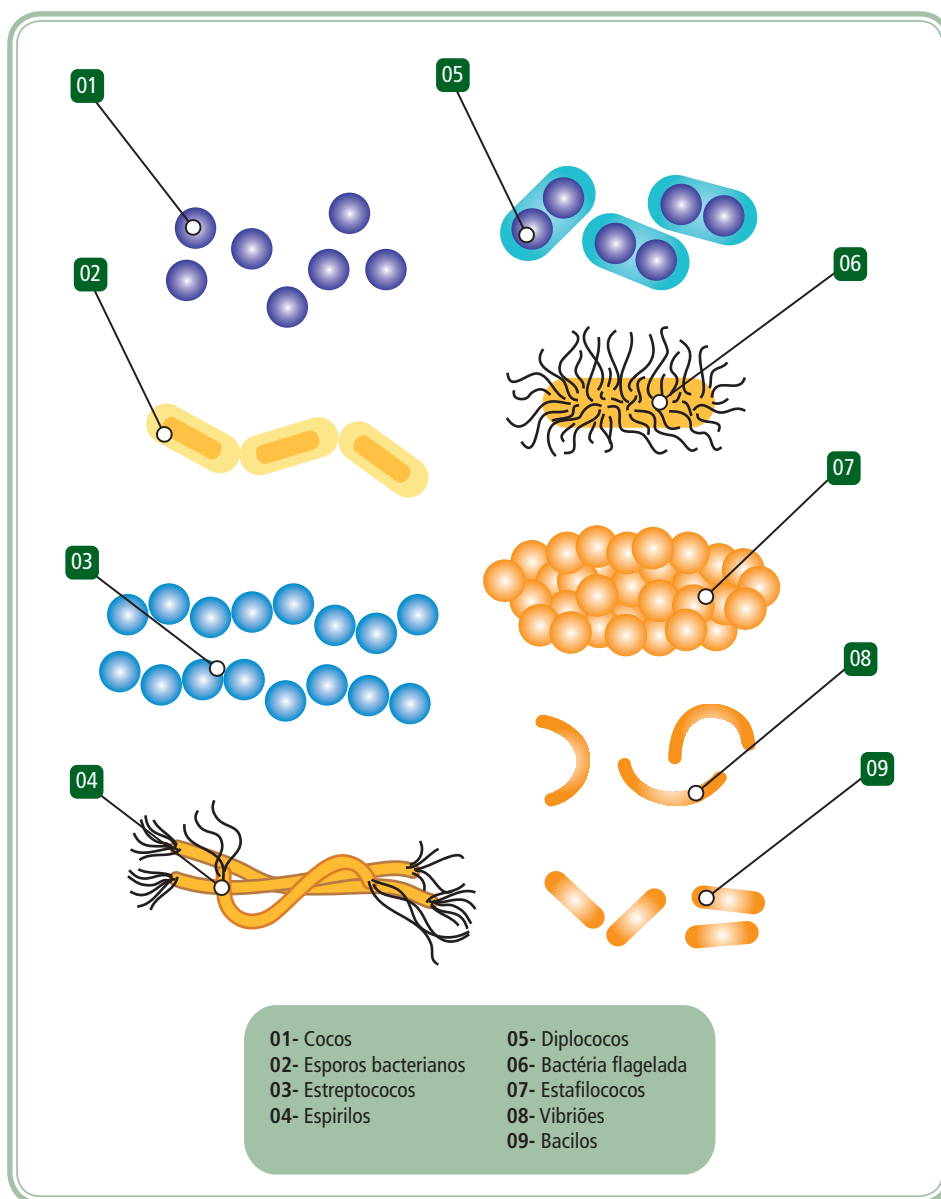


Figura 2.1: Morfologia das bactérias

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <http://www.cientic.com/tema_monera_img5.html>. Acesso em: 22 ago. 2012

2.2 Estrutura bacteriana

Caro aluno, o tamanho, a forma e o arranjo das bactérias constituem sua morfologia grosseira e sua aparência externa. A observação interna das estruturas celulares dá-nos uma ideia de como a bactéria funciona no ambiente.

Com isso, as técnicas de microscopia revelam que uma célula bacteriana tem uma diversidade de estruturas funcionando juntas. Algumas dessas estruturas são encontradas externamente fixadas à parede celular, enquanto outras são

internas, algumas são comuns a todas as células, tais como membrana citoplasmática e parede celular, já outros componentes estão presentes somente em certas espécies ou sob condições ambientais.

Na figura a seguir, podemos visualizar a estrutura de uma célula procariótica típica.

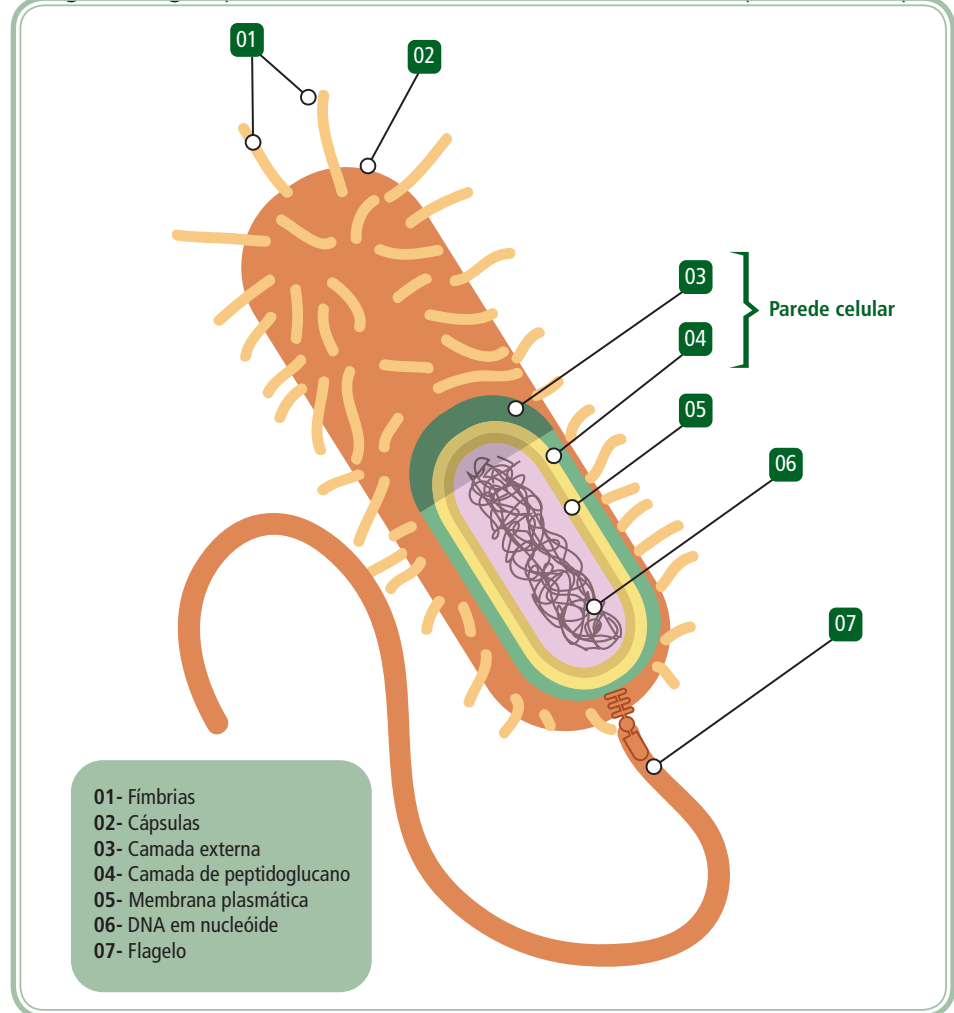


Figura 2.2: Estrutura bacteriana típica

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/bacterias/reino-monera-2.php>>. Acesso em: 20 ago. 2012.



De acordo com a Figura 2.2, faça uma pesquisa com o resumo da função dos principais componentes da estrutura bacteriana típica.

2.2.1 Membranas e paredes celulares

Agora passaremos a considerar duas importantes estruturas celulares: membrana e parede celular. Cada uma desempenha funções críticas e bem definidas na célula, incluindo o transporte de nutrientes (membrana) e a proteção contra a lise osmótica (parede).

2.2.1.1 Membrana citoplasmática

É a mais simples barreira que separa o conteúdo celular do meio externo. A membrana desempenha vários papéis fundamentais nas funções celulares. Em primeiro lugar, e acima de tudo, atua como **barreira de permeabilidade**, impedindo o extravasamento passivo dos constituintes citoplasmáticos. Além disso, essa membrana corresponde ao sítio de localização de várias proteínas. Destas, algumas são enzimas e outras estão envolvidas no transporte de substâncias para dentro e fora da célula (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003).

2.2.1.2 Parede celular

A parede celular de organismos procarióticos é uma estrutura rígida que mantém a forma característica de cada célula bacteriana. A estrutura é tão rígida que mesmo altas pressões ou outras condições físicas adversas raramente mudam a forma das células bacterianas. A parede celular previne a expansão e eventualmente rompimento da célula devido à entrada de água (a maioria das bactérias vive em ambientes que induzem a absorção de água pela célula). A parede celular bacteriana é, normalmente, essencial para o crescimento e divisão da célula. Dependendo da espécie e das condições da cultura, a parede celular pode corresponder a cerca de 10 a 40% do peso seco da célula (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

As paredes celulares não são estruturas homogêneas, mas são camadas de diferentes substâncias que variam de acordo com o tipo de bactéria envolvida. Elas diferem em espessura, assim como em composição. Essas diferenças ajudam a classificar as bactérias, dando traços típicos como, por exemplo, sua habilidade em causar doença (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

Esporos: os esporos que se formam dentro da célula são chamados endósporos e são exclusivos das bactérias. Possuem parede celular espessa e que os torna altamente resistentes.



2.2.2 Estruturas externas à parede celular

Caro aluno, a parede celular delimita a parte externa e a interna da célula, portanto, agora, vamos ver as estruturas que fazem parte da área externa.

2.2.2.1 Flagelos e Pelos

Podemos dizer que os flagelos são os “cabelos” da célula. Eles são apêndices muito finos, que se exteriorizam através da parede celular e se originam de uma estrutura granular (corpo basal) imediatamente abaixo da membrana citoplasmática, no citoplasma.

O flagelo apresenta três partes: uma estrutura basal, uma estrutura semelhante a um gancho e um longo filamento externo à parede celular, conforme você pode observar na figura a seguir.

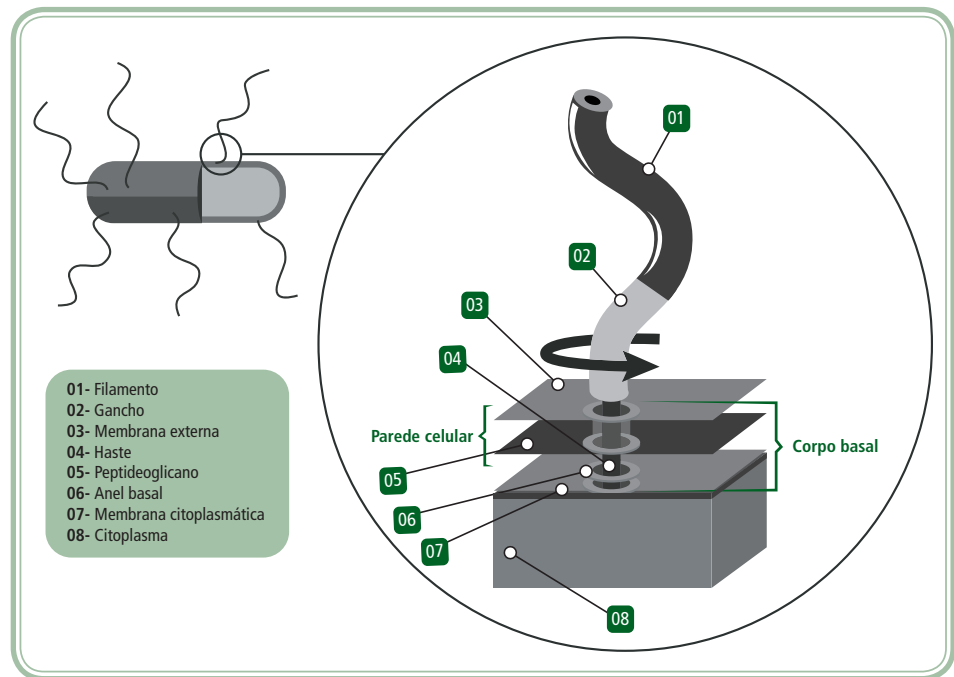


Figura 2.3: Corpo basal

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: Pelczar (1996)

O comprimento do flagelo é, usualmente, várias vezes o da célula, mas seu diâmetro é uma pequena fração do diâmetro celular (BOSSOLAN, 2002). Sua principal função é a locomoção. Nem todas as bactérias possuem flagelos (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

Os pelos, fímbrias ou cílios são apêndices filamentosos menores, mais curtos e mais numerosos que os flagelos, e que não formam ondas regulares. São encontrados tanto nas espécies móveis como nas imóveis e, portanto, não desempenham papel relativo à mobilidade. Podem funcionar como sítios de adsorção de vírus bacterianos, como mecanismo de aderência a superfícies e como porta de entrada de material genético durante a conjugação bacteriana (BOSSOLAN, 2002).

2.2.2.2 Glicocálice

Uma outra estrutura externa à parede celular é a chamada Glicocálice. A glicocálice é formada de uma substância viscosa, que forma uma camada de cobertura ou envelope ao redor da célula. Se a glicocálice estiver organizada de maneira

definida e estiver acoplada firmemente à parede celular, recebe o nome de **cápsula**; se estiver desorganizada e sem qualquer forma e ainda estiver frouxamente acoplada à parede celular, recebe o nome de **camada limosa** (BOSSOLAN, 2002). A glicocálice apresenta diversas funções, dependendo da espécie bacteriana. A aderência é a principal delas (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

2.2.3 Estruturas internas à parede celular

Agora que já estudamos as estruturas externas à parede celular, iremos ver as estruturas que são internas à parede celular.

2.2.3.1 Área citoplasmática

Em qualquer célula, o citoplasma tem em torno de 80% de água, além de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídeos, íons inorgânicos e partículas com várias funções (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

Os *ribossomos*, que são partículas densas, estão dispersos no citoplasma e são o sítio da síntese de proteínas. Eles são encontrados em todas as células procarióticas e eucarióticas. Alguns são encontrados livres no citoplasma procariótico, enquanto outros estão associados à superfície interna da membrana citoplasmática (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

2.2.3.2 Material nuclear

As células bacterianas não contêm o núcleo típico das células animais e vegetais. O material nuclear consiste de um cromossomo único e circular e ocupa uma posição próxima do centro da célula. Pode ser chamado de *corpo cromatínico*, *nucleoide*, *equivalente nuclear* ou *cromossoma bacteriano* (BOSSOLAN, 2002).

2.3 Reprodução

Caro aluno, agora que já sabemos quais as estruturas que estão localizadas internamente e externamente à parede celular de uma célula microbiana, vamos saber como ocorre a reprodução destas células.

A maioria das bactérias se multiplica pelo processo de reprodução assexuada, um processo que não envolve células sexuais (gametas). Assim, novas células surgem apenas de uma célula parental. Em microrganismos unicelulares, cada célula divide-se em duas células-filhas idênticas. Anterior à divisão celular, os conteúdos celulares se duplicam e o nucleoide é replicado (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

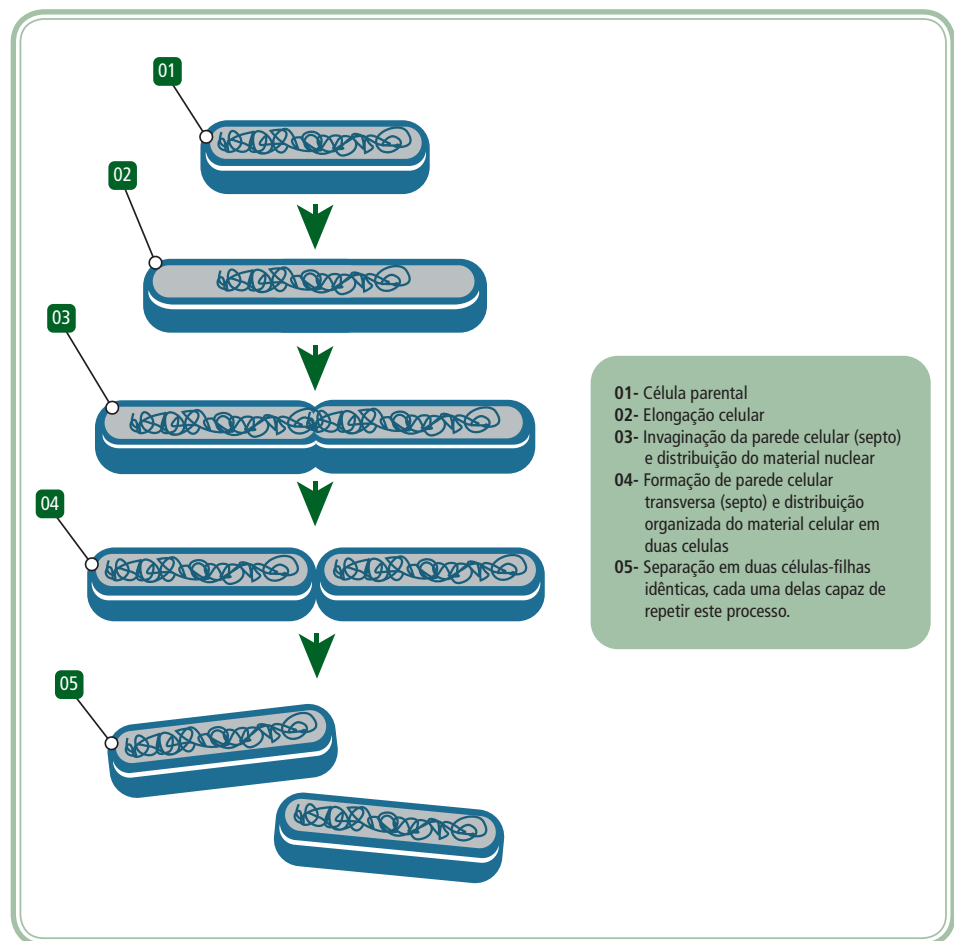


Figura 2.4: Reprodução por fissão binária

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: PELCZAR, CHAN E KRIEG (2009)

Alguns procarionotos se reproduzem assexuadamente por modelos diferentes daqueles da fissão binária, podendo ser por *brotamento*. Este *brotamento* ocorre por meio do crescimento de uma pequena protuberância em uma extremidade da célula que aumenta e, eventualmente, torna-se uma nova célula com todos os constituintes celulares, separando-se da célula parental (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

Existem, ainda, as bactérias que produzem um crescimento filamentosos, reproduzindo-se pela *fragmentação* dos filamentos de células pequenas cocóides ou em forma de bastão, cada uma das quais dá origem a um novo crescimento (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

2.4 Fungos

Todos os organismos procarióticos são microrganismos, ainda que somente um pequeno grupo de organismos eucarióticos incluam microrganismos, como os fungos, as algas e os protozoários. Contudo, entre eles estão presentes espécies muito grandes para serem consideradas microscopias. Como exemplos, temos o joio do mar, que são algas, e os cogumelos, que são fungos (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003).

2.4.1 Morfologia

Assim como estudamos a morfologia das bactérias, agora vamos estudar a morfologia dos fungos, ou seja, vamos saber o tamanho que os fungos possuem. Vimos que a grande maioria das bactérias não poderiam ser vistas a olho nu, ou seja, sem o auxílio de um microscópio, porém agora veremos que os fungos são bem maiores, podendo ser vistos sem o auxílio de microscópios.

As leveduras e os bolores são fungos, mas eles diferem na sua morfologia. As leveduras são unicelulares e, geralmente, maiores que as bactérias, variando em tamanho de 1 a 5 μm em largura e 5 a 30 μm ou mais em comprimento. São, normalmente, ovais, mas, algumas vezes, alongadas ou esféricas. As leveduras não têm flagelos nem outros meios de locomoção.

Sobre um meio com Ágar, elas formam colônias lisas e brilhantes que lembram as colônias bacterianas, essas colônias são muito diferentes das colônias espalhadas, aveludadas ou filamentosas formadas pelos bolores (MADIGAN, MARTINKO E PARKER; 2003).

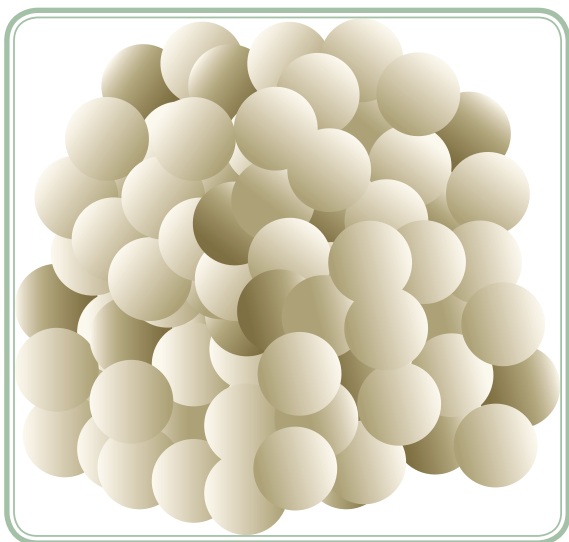


Figura 2.5: Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <http://www.ufrgs.br/alimentus/pao/ingredientes/ing_fermento01_e.htm>. Acesso em: 22 ago. 2012.

Ágar (*Saccharomyces cerevisiae*): grupo de leveduras muito utilizado na fabricação de bebidas alcoólicas, pães, bolos, biscoitos e outros.

Diferentemente das leveduras unicelulares, os bolores são organismos multicelulares que aparecem como filamentos sob baixa ampliação. O corpo, ou *talo*, de um fungo filamentoso consiste em um *micélio*. Cada *micélio* é uma massa de filamentos chamada *hifa*. Cada *hifa* tem em torno de 5 a 10 μm de largura e é formada pela reunião de muitas células (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

2.4.2 Parede celular

As plantas, as algas e os fungos têm parede celular, enquanto outras células eucarióticas não têm. A parede celular dos fungos difere da parede celular das bactérias, tanto em estrutura química quanto em estrutura física. Por exemplo, as paredes celulares eucarióticas não contêm peptidoglicanos, o constituinte principal das paredes celulares bacterianas. Os fungos filamentosos têm paredes celulares que contêm quitina e celulose, enquanto as leveduras unicelulares têm, nas paredes celulares, mananas, um polímero da manose (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

2.5 Reprodução

Nós vimos que a reprodução das bactérias se dá, em sua grande maioria, de forma assexuada. Entre os microrganismos eucarióticos, existem dois tipos de reprodução: **assexuada e sexuada**.

2.5.1 Reprodução assexuada

Este tipo de reprodução não envolve a união de núcleos, células sexuais ou órgãos sexuais. Ela não implica variação genética, mas é mais eficiente que a reprodução sexuada em propagar as espécies. Na reprodução assexuada, novos indivíduos são reproduzidos por um organismo parental, ou, no caso de organismos unicelulares, por uma célula (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

A reprodução assexuada em organismos eucarióticos se dá por *mitose*. A *mitose* é uma forma de divisão nuclear na qual todos os cromossomos da célula são duplicados e os dois novos conjuntos separam para formar os núcleos-filhos. A célula, então, se divide em duas células-filhas, cada uma recebendo um núcleo. Desta forma, cada célula-filha tem o mesmo número de cromossomos e a mesma composição genética que a célula parental. A mitose é um processo contínuo, com cada fase unindo-se à fase seguinte (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

2.5.2 Reprodução sexuada

Na reprodução sexuada dos microrganismos eucarióticos, bem como em organismos maiores, um novo indivíduo é formado pela fusão de duas células sexuais diferentes, chamadas de *gametas*, que são procedentes de dois pais de sexos diferentes ou tipos de relação sexuada. A fusão de gametas é chamada de fertilização e a célula resultante é denominada *zigoto*. Os *zigotos* possuem uma mistura de material genético dos dois gametas. Por meio de divisões mitóticas, cada zigoto se torna um novo organismo (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

2.6 Classificação dos fungos

A classificação dos fungos é baseada, principalmente, nas características dos esporos sexuais e dos corpos de frutificação, na natureza de seus ciclos de vida e nas características morfológicas de seus micélios vegetativos ou de suas células.

Os micologistas dividem o reino Fungi em três principais grupos: os **fungos limosos**, os **fungos inferiores flagelados** e os **fungos terrestres** (BOSSOLAN, 2002).

Os **fungos limosos** são considerados um enigma biológico e taxonômico, porque não são nem um fungo típico, nem um protozoário típico. Durante uma de suas etapas de crescimento, assemelham-se aos protozoários, pois não possuem parede celular, possuem movimentos ameboides e ingerem nutrientes particulados. Durante a etapa de propagação, formam corpos de frutificação e esporângios apresentando esporos com paredes, como nos fungos típicos. Vivem em água doce, em solo úmido e em vegetais em decomposição (BOSSOLAN, 2002).

Os **fungos inferiores flagelados** incluem todos os fungos, com exceção dos limosos, que produzem células flageladas em alguma fase do seu ciclo de vida. Alimentam-se pela absorção dos alimentos. A grande maioria é filamentosa, produzindo um micélio cenocítico. Muitos são unicelulares ou unicelulares com rizoides. A reprodução sexuada pode ocorrer por vários meios; a reprodução assexuada ocorre mediante a produção de zoósporos. Podem ser parasitas ou saprófitas, que vivem no solo ou na água doce (BOSSOLAN, 2002).

Os **fungos terrestres** são as espécies mais conhecidas entre os fungos. Esse grupo inclui as leveduras, bolores, orelhas-de-pau, mofo, fungos em forma de

taça, ferrugem, carvão, bufa-de-lobo e cogumelos. Todos se caracterizam pela nutrição através da absorção e, com exceção das leveduras, a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas. As células móveis não são encontradas nos fungos terrestres. A reprodução assexuada ocorre por meio de brotamento, fragmentação e produção de esporangióforos ou conídios. A reprodução sexuada envolve a produção de zigósporos, ascósporos ou basidiósporos. Existem quatro principais grupos de fungos terrestres: **Zygomycetes**, **Ascomycetes**, **Basidiomycetes** e **Deuteromycetes** (BOSSOLAN, 2002).

2.7 Vírus

Os vírus constituem um grupo grande e heterogêneo de agentes infecciosos, semelhantes pelo fato de serem parasitas intracelulares obrigatórios para as células de seus hospedeiros específicos. São tão pequenos que passam através dos filtros cujos poros não permitem a passagem das bactérias.

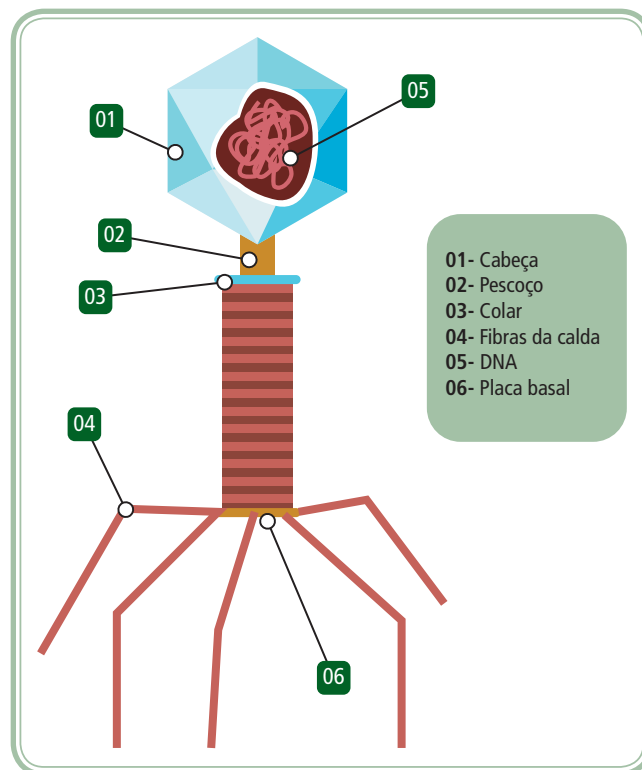


Figura 2.6: Vírus fago

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <<http://professoracabral.blogspot.com.br/2008/02/2-ano-vrus.html>>. Acesso em: 22 ago. 2012.

A-Z

Fago: vírus que ataca bactérias.

2.8 Estrutura dos vírus

Os menores vírus têm somente 17 nm de diâmetro e os maiores chegam a 1000nm (1 micrômetro). Mesmo os maiores têm uma pobre visibilidade ao microscópio óptico. A maioria dos vírus só pode ser detectada usando microscopia eletrônica de alta resolução (BOSSOLAN, 2002).

Cada partícula viral (ou **vírião**) pode ter as seguintes estruturas:

Capsídeo e Envelope: o *capsídeo* é uma capa proteica que circunda o ácido nucleico, e é composto de subunidades de proteína, os *capsômeros*, que são responsáveis pela especificidade viral. Todos os *víriões* possuem uma simetria de estrutura, podendo ou não apresentar um envoltório (*envelope*) contendo lipídeos ou lipoproteínas. Assim, os *víriões* com envelope são sensíveis aos solventes de lipídeos, tais como o éter, o clorofórmio e os agentes emulsificantes (sais biliares e detergentes) (BOSSOLAN, 2002).

Ácidos nucleicos: os vírus podem ter DNA ou RNA, mas nunca são encontrados os dois juntos no mesmo *vírião* (BOSSOLAN, 2002).

Faça uma pesquisa para responder a seguinte pergunta: os vírus são capazes de contaminar os alimentos? De que forma?



Resumo

Nesta aula, você pode identificar as principais características das bactérias como sua morfologia, forma e arranjo, assim com os componentes da estrutura bacteriana externas e internas à parede celular. Também vimos que os fungos se dividem em bolores e leveduras, estudando sua morfologia, seu modo de reprodução e sua parede celular. Com relação aos vírus, estudamos sua estrutura.

Atividade de aprendizagem

1. O que é um biofilme?
2. Quais as formas em que as bactérias podem se apresentar?
3. Quais os principais componentes da célula bacteriana?
4. Defina e identifique a importância da membrana citoplasmática e da parede celular nos organismos procarióticos.
5. Explique a função dos componentes externos à parede celular nos procarióticos.
6. Explique a função dos componentes internos à parede celular nos procarióticos.
7. Diferencie os tipos de reprodução nos organismos eucarióticos e procarióticos.
8. Explique a reprodução por fissão binária.
9. Diferencie bolores de leveduras.
10. Qual a diferença da parede celular das bactérias e fungos?
11. Como os fungos se classificam? Explique.
12. Fale sobre a estrutura dos vírus.

Aula 3 – Crescimentos dos microrganismos

Objetivos

Descrever as fases de crescimento dos microrganismos e diferenciar os fatores que regulam o crescimento deles.

3.1 Curva de crescimento dos microrganismos

Caro aluno, na última aula, estudamos as principais formas de reprodução dos microrganismos. Nesta aula, iremos descrever e diferenciar as fases de crescimento e os fatores que influenciam este crescimento. Devemos entender que quando os microrganismos chegam aos alimentos, se as condições são favoráveis, inicia-se a multiplicação e crescimento, passando por uma série de fases sucessivas. Assim, vamos começar falando sobre o tempo que os microrganismos levam para multiplicar-se e quais fases eles passam.

3.2 Tempo de duplicação

Tempo de duplicação (também chamado de tempo de geração) é o período necessário para que as células em uma população microbiana aumentem, dividam e produzam duas novas células para cada uma que existia anteriormente. O tempo de duplicação de todas as células em uma população em crescimento é quase o mesmo, ele não muda até que os nutrientes se acabem ou produtos metabólicos tóxicos comecem a se acumular. Conforme as condições para o crescimento se tornam menos favoráveis, o tempo de duplicação aumenta. Eventualmente, o crescimento para (INGRAHAM & INGRAHAM; 2010).

O tempo de duplicação nos diz o quão rápido uma população cresce, mas a relação é inversa, ou seja, um valor baixo de tempo de duplicação indica crescimento rápido e um valor alto indica crescimento lento (INGRAHAM & INGRAHAM; 2010).

3.3 Fases da curva de crescimento dos microrganismos

O tempo de duplicação de uma população microbiana não muda desde que as condições sejam favoráveis. O resultado é o crescimento exponencial (log), que resulta em um aumento quase explosivo em números e massa celular.

A-Z

Crescimento exponencial

As funções exponenciais são caracterizadas pelo fato de que, ao longo do tempo, seus valores dobram, no caso de exponenciais crescentes.

É claro que o **crescimento exponencial** não pode continuar por muito tempo. O número crescente de células utiliza nutrientes e produz resíduos em taxas sempre crescentes. Algo tem que acontecer!

De acordo com a **Figura 3.1**, podemos visualizar as principais fases de crescimento dos microrganismos.

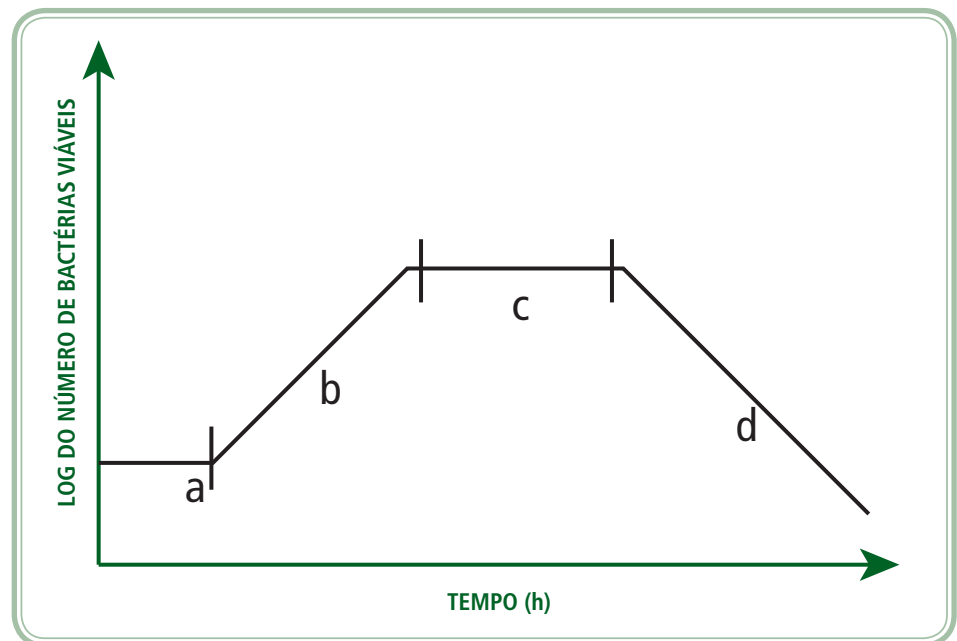


Figura 3.1: Fases de crescimento de uma cultura bacteriana típica

Fonte: Gava (1984)

- a) Fase de latência ou lag: existe um período inicial no qual parece não haver crescimento em termos de aumento de número de células, chamada de **fase lag**. Embora as células não estejam se dividindo durante a fase lag, ainda são metabolicamente ativas, reparam os danos celulares e sintetizam enzimas.
- b) Fase logarítmica: a fase lag é seguida por um período de rápido crescimento, chamado de **fase log** (ou fase de crescimento exponencial).

- c) Fase estacionária: fase durante a qual nenhum crescimento novo é evidente.
- d) Fase de declínio ou morte: nesta fase existe um declínio na população viável até que todas as células microbianas morram (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 2009).

As células mudam à medida que passam da fase exponencial para a fase estacionária. Elas ficam menores e começam a sintetizar componentes para sobreviver, já que não podem crescer mais. Elas também mudam a composição de ácidos graxos em suas membranas. Apesar dessas mudanças, as culturas que estão em fase estacionária começam a morrer depois de um dia ou mais (INGRAHAM & INGRAHAM; 2010).

3.4 Fatores que regulam o crescimento dos microrganismos

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos que estão presentes em um alimento depende de uma série de fatores. Entre esses fatores estão aqueles relacionados com as características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos) (FRANCO & LANGRAF, 2008).

3.4.1 Fatores intrínsecos

a) Atividade de água

Os microrganismos necessitam de água para sua sobrevivência. Para seu metabolismo e multiplicação, os microrganismos exigem a presença de água na forma disponível. A água ligada à macromolécula por forças físicas não está livre para agir como solvente ou participar de reações químicas, portanto, não pode ser aproveitada pelos microrganismos. O parâmetro que mede a disponibilidade de água em um alimento denomina-se **Atividade de água** (A_a ou A_w) (FRANCO; LANGRAF, 2008).

O parâmetro A_a corresponde à razão entre a pressão de vapor do ar em equilíbrio com uma substância ou solução em relação à pressão de vapor da água pura. Dessa maneira, a A_a pode variar de 0 a 1 (MADIGAN; MARTINKO E PARKER, 2003). A maioria do crescimento bacteriano é impossível quando a A_a é menor do que 0,90. Grande parte dos fungos é inibida entre valores de 0,80 a 0,88. (GAVA, 1984).



Procure saber sobre a diferença entre atividade de água e umidade de alimentos.

b) Acidez (pH)

Assim como ocorre com a A_w , os microrganismos têm valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação. Verifica-se que o pH em torno da neutralidade, isto é, 6,5 e 7,5, é o mais favorável para a maioria dos microrganismos. Alguns microrganismos são favorecidos pelo meio ácido, como ocorre com as bactérias lácticas. Os bolores e as leveduras mostram maior tolerância ao pH, sendo que os bolores podem multiplicar-se em valores de pH mais baixo que as leveduras, sendo estas, por sua vez, mais tolerantes que as bactérias a valores baixos de pH (FRANCO; LANGRAF, 2008).



As bactérias lácticas são um grupo de bactérias utilizadas nos processos industriais de fermentação e conservação de alimentos, sendo sua principal função a acidificação dos produtos, o que impede o desenvolvimento de outros grupos de microrganismos. Outro papel dessas bactérias é desenvolver propriedades sensoriais características.

De acordo com o pH, os alimentos são subdivididos em três grandes grupos:

- Alimentos de baixa acidez: $\text{pH} > 4,5$
- Alimentos ácidos: pH entre 4,0 e 4,5
- Alimentos muito ácidos: $\text{pH} < 4,0$

Dessa forma, alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$) são os mais sujeitos à multiplicação microbiana, tanto de espécies patogênicas como de espécies deteriorantes. Essa classificação está baseada no pH mínimo para multiplicação e produção de toxina do *Clostridium botulinum* (FRANCO; LANGRAF, 2008).



- Espécies patogênicas: microrganismos que causam doenças.
- Espécies deteriorantes: microrganismos que causam alterações sensoriais nos alimentos (cor, cheiro, sabor, textura, viscosidade etc.).

Faça uma pesquisa sobre a bactéria *Clostridium botulinum*, destacando quais os principais alimentos envolvidos e as formas de prevenção.



O pH da carne obtida de animais fatigados é mais alto que aquele observado em carne proveniente de animais descansados.

Após a morte, o glicogênio de reserva é transformado em ácido lático, abaixando o pH inicial do músculo de cerca de 7,4 para cerca de 5,6, dependendo do tipo de animal. O estresse no qual o animal é submetido antes do abate provoca a metabolização do glicogênio antes da sua morte, reduzindo a quantidade de ácido lático que pode ser produzida após a morte do animal, resultando em uma carne com pH mais elevado (FRANCO; LANGRAF, 2008).

c) Disponibilidade de oxigênio

A tensão ou pressão parcial do oxigênio, bem como o potencial de oxideredução (poder oxidante ou redutor) do alimento determina os tipos de microrganismo que se desenvolverão. Do ponto de vista de aproveitamento de oxigênio livre, os microrganismos podem ser classificados em aeróbios, anaeróbios e facultativos, conforme a **Figura 3.2**, mostrada a seguir (GAVA, 1984).

Oxirredução: os processos de oxidação estão relacionados com a troca de elétrons entre compostos químicos. O potencial de oxido redução pode ser definido como sendo a facilidade com que determinado substrato ganha ou perde elétrons. Quando um elemento perde elétrons, ele é dito oxidado, e quando ganha elétrons, reduzido.

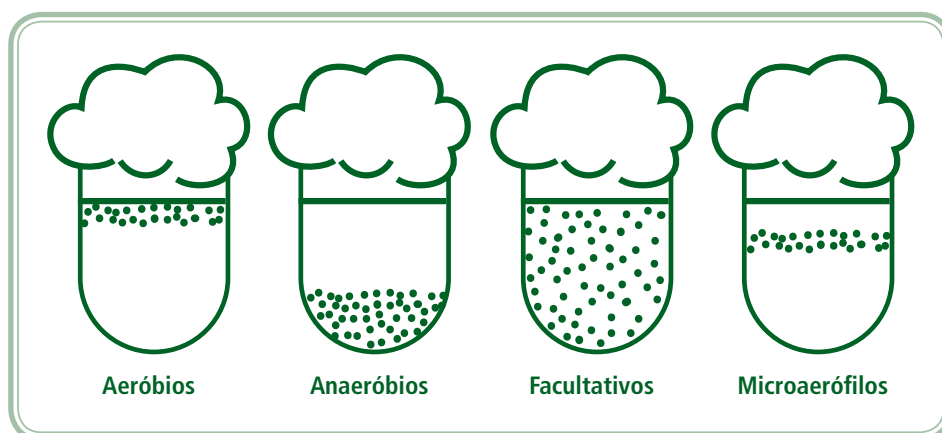


Figura 3.2: Crescimento de microrganismos em relação ao oxigênio do ar
Fonte: Gava (1984)

Aeróbios: necessitam de oxigênio.

Anaeróbios: se desenvolvem na ausência de oxigênio.

Facultativos: vivem em condições anaeróbias ou aeróbias.

Microaerófilos: o crescimento é melhor em uma pressão de reduzida de oxigênio.

d) Constituintes antimicrobianos e estrutura biológica

A estabilidade de alguns produtos de origem animal e vegetal ocorre na natureza devido à presença de constituintes antimicrobianos. As porções mais internas dos tecidos sadios animais ou vegetais são estéreis ou possuem pequena carga microbiana. Portanto, a menos que os microrganismos penetrem, a parte interna dos tecidos é praticamente livre de seres vivos (GAVA, 1984).



Faça uma pesquisa sobre quais alimentos possuem constituintes antimicrobianos naturais e quais são estes constituintes.

Algumas opções para esta pesquisa são:

<<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. <<http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/index.php?op=32>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

<http://www.unicamp.br/nepa/arquivo_san/volume_16_1_2009/090909-Felix-14115-Diagramado-49-64.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2012.

e) Interações entre microrganismos

Um determinado microrganismo, ao se multiplicar em um alimento, produz metabolitos que podem afetar a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros microrganismos presentes nesse alimento. Um exemplo típico são as bactérias lácticas, que alteram o pH do alimento de tal forma que o tornam ácido demais para o crescimento de muitos outros grupos (FRANCO & LANGRAF, 2008).

3.4.2 Fatores extrínsecos

Caro aluno, até agora vimos os fatores intrínsecos que influenciam no crescimento microbiano, agora vamos estudar os fatores extrínsecos, que são aqueles relativos ao ambiente, como temperatura, presença de gases, umidade relativa do ar e irradiação.

a) Temperatura

A temperatura é um dos fatores, senão o mais importante fator ambiental, que afeta o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Estes não são capazes de crescer em temperaturas muito frias ou muito quentes. Entretanto, os valores absolutos das temperaturas mínimas e máximas variam de maneira ampla dentre os diferentes microrganismos, usualmente refletindo a variação térmica e a temperatura média de seus habitats (MADIGAN; MARTINKO E PARKER, 2003).

As possibilidades de alteração dos alimentos estão compreendidas numa faixa de temperatura que vai de -5°C a 70°C . Como já podemos notar, os microrganismos diferem no ótimo, mínimo e máximo de temperatura e, portanto, a temperatura que um alimento estiver influenciará no tipo, na velocidade e na extensão das transformações. **A temperatura ótima é aquela na qual o crescimento é rápido.** É comum classificar os microrganismos conforme o seu comportamento em relação à temperatura, em:

- Psicrófilos: desenvolvem-se em temperatura baixas (0°C a 20°C).
- Mesófilos: desenvolvem-se em temperaturas intermediárias (20°C a 45°C).
- Termófilos: desenvolvem-se em temperaturas mais elevadas (45°C a 60°C) (GAVA, 1984).

Existe ainda o termo **termodúrico**, que corresponde aos microrganismos resistentes ao calor.



b) Umidade relativa do ambiente

Há uma correlação estreita entre A_a de um alimento e umidade relativa de equilíbrio do ambiente. Quando o alimento está em equilíbrio com a atmosfera, a umidade relativa (UR) é igual a $A_a \times 100$. Assim, os alimentos conservados em

ambiente com UR superior a sua A_a tenderão a absorver umidade do ambiente, causando aumento em sua A_a . Por outro lado, os alimentos perderão água se a umidade ambiental for inferior a sua A_a , causando diminuição nesse valor. Essas alterações provocarão modificações na capacidade de multiplicação dos microrganismos presentes, que será determinada pela A_a final, conforme discutido (FRANCO; LANGRAF, 2008).

c) Composição gasosa do ambiente

A composição gasosa do ambiente que envolve um alimento pode determinar os tipos de microrganismos que poderão nele predominar. A presença de oxigênio favorecerá a multiplicação de microrganismos aeróbios, enquanto que sua ausência causará predominância dos anaeróbios, embora haja bastante variação na sensibilidade dos anaeróbios ao oxigênio. Modificações na composição gasosa são capazes de causar alterações na microbiota que sobrevive ou que se multiplica em determinado alimento (FRANCO; LANGRAF, 2008).

Resumo

Nesta aula, você estudou quais as fases de crescimento dos microrganismos e quais os fatores que influenciam neste crescimento. Viu os fatores extrínsecos e intrínsecos que influenciam diretamente sobre o crescimento .

Atividade de aprendizagem

1. Qual o significado de crescimento exponencial de uma cultura bacteriana?
2. Por que o crescimento das bactérias é considerado uma progressão geométrica?
3. Diferencie *fase lag* de *fase log*.
4. Que fatores influenciam a saída da *fase log* para a *fase de declínio* ou *morte*?
5. Cite os fatores extrínsecos e intrínsecos estudados.
6. Explique por que um animal estressado no momento do abate pode ter sua carne mais facilmente contaminada.
7. Qual o comportamento dos microrganismos com relação à temperatura?
8. Qual a relação existente entre a umidade e a A_w de alimentos?
9. Qual o comportamento dos microrganismos quanto à disponibilidade de oxigênio?
10. O que significa composição gasosa do ambiente e de que forma esse parâmetro influencia no crescimento microbiano?

Aula 4 – Doenças de origem alimentar, infecções e intoxicações alimentares

Objetivos

Identificar os principais perigos de contaminação em alimentos e seus veículos de transmissão.

Analisar os surtos por contaminação alimentar, exemplificando-os.

Diferenciar infecções de intoxicações alimentares.

4.1 Perigos de contaminação em alimentos

Caro aluno, o estudo sobre os agentes causadores de doenças alimentares é de extrema importância para que possamos eliminá-los de nosso cotidiano. Mas você sabe o que é um perigo alimentar? Segundo o **Codex Alimentarius**, o conceito de perigo alimentar é qualquer propriedade biológica, física ou química que possa tornar um alimento prejudicial ao consumo humano. Os perigos devem ser de tal natureza que sua eliminação ou redução a níveis aceitáveis seja essencial para a produção de alimentos **inócuos**.

4.1.1 Perigos biológicos

Entre os três tipos de perigos, o perigo biológico é o que mais representa risco à inocuidade dos alimentos. Nessa categoria de perigo englobam-se as bactérias, fungos, vírus, parasitas e toxinas microbianas. Esses organismos vivem e desenvolvem-se nos manipuladores e podem ser transmitidos aos alimentos pelos mesmos. Outros ocorrem naturalmente no ambiente em que os alimentos são produzidos. A maior parte é destruída por processamentos térmicos e muitos podem ser controlados por práticas adequadas de armazenamento e manipulação, boas práticas de higiene e fabrico e de controle adequado do tempo e temperatura dos processos.

4.1.2 Perigos químicos

Nessa categoria de perigos inclui-se um vasto conjunto de perigos de origem diversa, desde aqueles que se encontram associados às características das próprias matérias-primas até perigos criados ou introduzidos durante o processo,

A-Z

Codex Alimentarius

Expressão em latim que significa “código alimentar” ou “livro sobre alimentos” é uma coletânea de padrões reconhecidos internacionalmente, códigos de conduta, orientações e outras recomendações relativas à alimentos, produção de alimentos e segurança alimentar.

Inócuos

Alimento inócuo é aquele livre de contaminação (microbiológica, física ou química), ou seja, não trará risco a saúde dos consumidores.

passando por aqueles que resultam da contaminação das matérias primas utilizadas. Desse conjunto de perigos químicos, destacam-se os aditivos alimentares (usados em concentrações excessivas); os pesticidas; medicamentos veterinários; metais pesados; toxinas naturais (ex.: cogumelos, peixes exóticos, marisco); alérgenos (ex.: glúten, lactose); substâncias naturais vegetais (ex.: solanina da batata); químicos criados pelo processo ou introduzidos no processo (ex.: produtos de limpeza e desinfecção).

4.1.3 Perigos físicos

É um vasto conjunto de perigos de origem diversa presentes em matérias-primas, como, por exemplo, pedaços metálicos, raspas de madeira, cascas de ovos, cabelo, vidro, plásticos ou até objetos que podem ser introduzidos nos produtos pelos próprios manipuladores, como aliança ou brinco. Para evitar esse tipo de problema, os manipuladores de alimentos devem retirar todos os adornos antes da manipulação com alimentos.



Figura 4.1: Perigo biológico, químico e físico.

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: Cartilha do manipulador de alimentos-indústria/Senai (2009).

Caro aluno, com a próxima atividade você irá treinar suas habilidades quanto à identificação dos tipos de perigos estudados. Vamos ver se você já sabe a diferença entre os perigos causadores de doenças alimentares.



Relacione as colunas:

- | | |
|------------------------|---|
| (1) Perigo físico | () Bactérias patogênicas |
| (2) Perigo químico | () Casca de ovo |
| (3) Perigo biológico | () Casca de arroz |
| | () Inseticidas |
| | () Excesso de cloro na sanitização de verduras |
| | () Mofo em pães |

4.2 Infecções e toxinfecções alimentares

De acordo com o dito anteriormente, você pode perceber que os principais perigos de contaminação em alimentos são aqueles causados por agentes biológicos. Esses agentes biológicos possuem diferentes formas de atuação frente aos alimentos e ao organismo de quem os consumir, por isso, para começarmos a entender como eles irão agir é necessário a distinção entre as doenças alimentares causadas por infecções e toxinfecções alimentares.

Então, vamos lá! As doenças microbianas de origem alimentar podem ser subdivididas em duas grandes categorias:

Infecções alimentares: causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos. Esses microrganismos aderem à mucosa do intestino e se proliferam, colonizando-o. Em seguida, pode ocorrer a invasão da mucosa e penetração nos tecidos, ou ainda, a produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato gastrointestinal.

Toxinfecções ou intoxicações alimentares: causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas. Essas toxinas são produzidas durante a intensa proliferação de microrganismos patogênicos nos alimentos (FRANCO; LANGRAF, 2008).

4.2.1 Infecções alimentares

Caro aluno, a seguir serão listados os principais microrganismos causadores de infecções.

a) *Salmonella*

O gênero *salmonella* é amplamente distribuído na natureza, sendo o trato intestinal de homens seu principal *habitat*. São anaeróbios facultativos e produzem gás a partir da glicose. O pH ótimo para a multiplicação das *salmonelas* fica próximo a 7,0 e elas não toleram concentrações de sal superiores a 9%. A temperatura que essa bactéria mais se desenvolve é de 35 à 37°C (FRANCO; LANGRAF, 2008). Os principais alimentos envolvidos são aqueles que possuem alto teor de umidade e ricos em proteínas, como ovos, produtos lácteos e carne e derivados (GERMANO; GERMANO, 2001).



Figura 4.2: *Salmonella sp*

Fonte: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SalmonellaNIAID.jpg>>. Acesso em: 3 dez. 2012.

b) *Shigella*

Sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C, mas também podem crescer de 10 a 40°C. Toleram concentrações de sal entre 5 e 6%. São microrganismos adaptados ao homem e primatas. A doença é disseminada por via fecal-oral, mas algumas vezes o alimento e a água entram nessa rota. A *Shigella* causa a disenteria, que certamente você já ouviu falar! É um tipo de diarreia com sangue (FRANCO; LANGRAF, 2008). Os alimentos envolvidos são aqueles que exigem um maior manuseio no seu preparo.

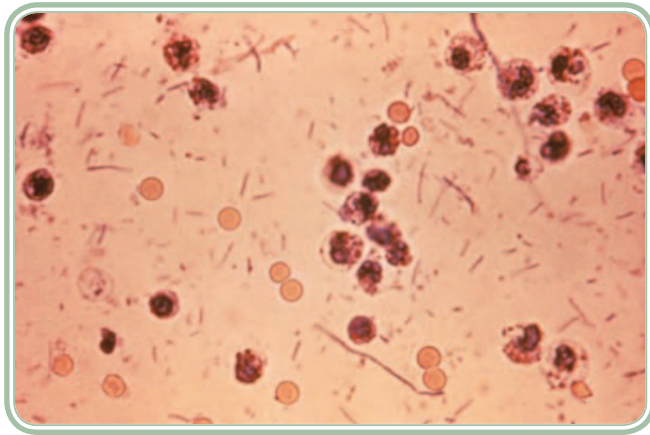


Figura 4.3: *Shigella* em amostra de fezes

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Shigella_stool.jpg>. Acesso em: 3 dez. 2012.

c) *Escherichia coli*

É uma espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da flora intestinal de animais de sangue quente (FRANCO; LANGRAF, 2008). Os sintomas dessa doença são: cólicas abdominais, diarreia com sangue, vômito e febre. Os principais alimentos envolvidos são a carne mal cozida, leite cru, água não clorada. Uma das formas de evitar essa doença é a correta lavagem das mãos antes de manipular os alimentos.

Homeotermia (termo antigo) ou **endotermia** (termo atual) é uma característica de alguns animais que lhes permite manter sua temperatura corporal relativamente constante à causa de uma alta taxa metabólica gerada pela intensa combustão de alimento energético nas células.



Fonte: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Homeotermia>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

Agora que já falamos um pouco sobre os principais microrganismos causadores de infecções alimentares, vamos conhecer aqueles que causam intoxicações ou toxinfecções alimentares.

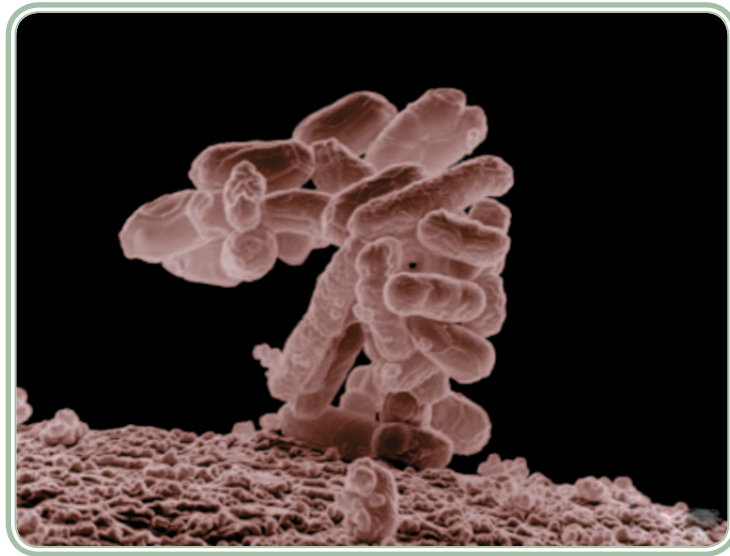


Figura 4.4: *Escherichia coli*

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:E_coli_at_10000x.jpg>. Acesso em: 3 dez. 2012.

4.2.2 Toxinfecções alimentares

a) *Clostridium botulinum*

Essa bactéria vive normalmente no solo e não é infecciosa, sendo incapaz de causar sintomas de envenenamento. Quando esse microrganismo encontra condições favoráveis de crescimento (ausência de oxigênio, umidade, pH, nutrientes) poderá produzir uma poderosa toxina que, mesmo em quantidades pequenas poderá ser fatal. Hoje em dia, os casos fatais têm diminuído bastante, mas ainda podem ser encontrados casos isolados, principalmente com o uso de vegetais e carnes enlatadas (GAVA, 1984). Atualmente, três formas de botulismos são conhecidas: botulismo clássico, botulismo de lesões e botulismo infantil (FRANCO; LANGRAF, 2008). Os sintomas do botulismo aparecem sob forma de alterações digestivas, transtornos visuais e nervosos. A morte pode ocorrer de 3 a 6 dias (GAVA, 1984).



O *Clostridium botulinum* não se desenvolve em pH < 4,6 (ácido), uma das causas dos surtos é a falta de acidez nas conservas.

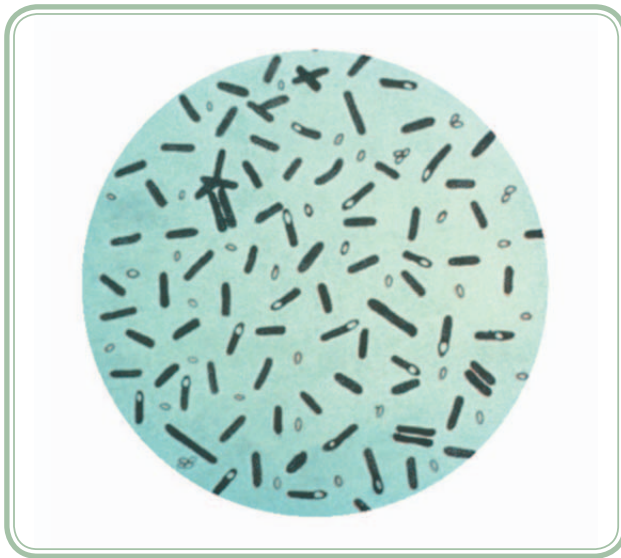


Figura 4.5: Clostridium botulinum

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Clostridium_botulinum.jpg>. Acesso em: 3 dez. 2012.

b) Staphylococcus aureus

São bactérias facultativas anaeróbias, com maior crescimento sob condições aeróbias. As bactérias desse gênero são tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl (sal) e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas (FRANCO; LANGRAF, 2008). Essa bactéria encontra-se amplamente distribuída em nossa pele, nariz e garganta. Os principais sintomas dessa doença são: náuseas, vômitos, câimbras abdominais, calafrios e queda da pressão arterial (GAVA, 1984). Não é uma doença fatal, a menos que o indivíduo esteja debilitado (FRANCO; LANGRAF, 2008).

Alimentos curados: o processo de cura é realizado acrescentando-se à carne alguns agentes de cura. Cada ingrediente tem característica única, apresenta e desempenha um papel importante no processo. Os ingredientes clássicos utilizados no processo são: cloreto de sódio, nitrato, nitrito. Esse é um importante método de conservação dos produtos embutidos.



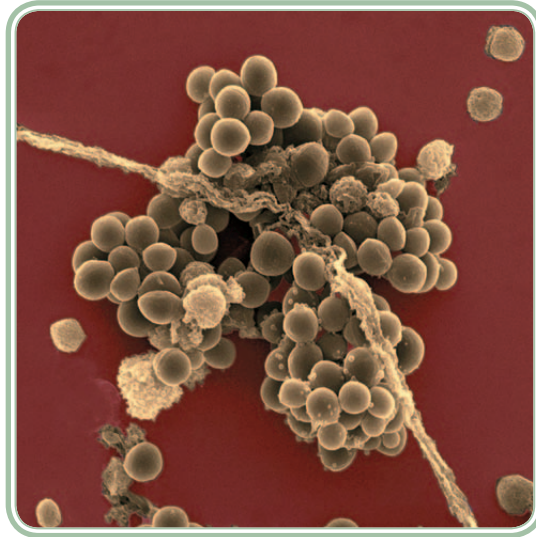


Figura 4.6: *Staphylococcus*

Fonte: <<http://www.pasteur.fr>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

c) *Bacillus cereus*

As bactérias pertencentes ao gênero *bacillus* compreendem um grande número de espécies. É uma bactéria aeróbia que se multiplica em temperaturas entre 28 e 35°C e pode causar duas formas distintas de gastroenterite: **síndrome diarreica** e **emética**, sendo a primeira causadora de diarreia e a segunda de vômitos (FRANCO; LANGRAF, 2008).

A-Z

Síndrome diarreica

A duração dessa doença é de 12 a 24h e está associada a vegetais crus e cozidos, produtos cárneos, pescado, massas, leite entre outros.

Síndrome emética

A duração é de 6 a 24 horas e está associada a alimentos farináceos, contendo cereais, principalmente arroz.

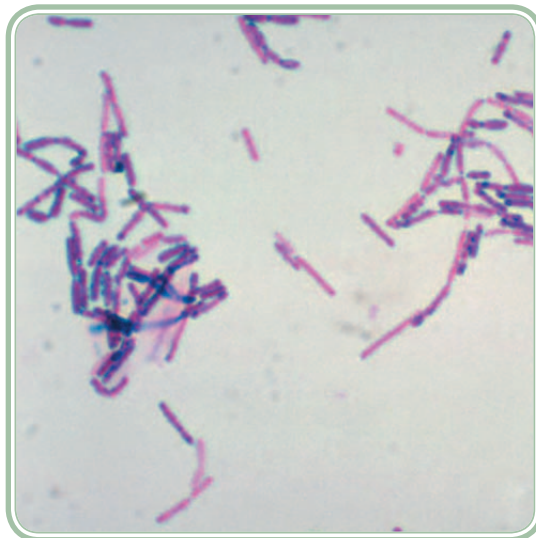


Figura 4.7: *Bacillus cereus*

Fonte: <<http://www.kimicontrol.com/edu>>. Acesso em: 3 dez. 2012.

Resumo

Nesta aula, você identificou os principais perigos de contaminação em alimentos, assim como diferenciou infecções de intoxicações alimentares através de exemplos e figuras.

Atividades de aprendizagem

1. Defina perigo químico, físico e biológico de contaminação de alimentos, exemplificando.
2. Como podemos evitar a contaminação de alimentos através dos perigos citados?
3. Como podemos diferenciar infecção de intoxicação ou toxinfecção alimentar?
4. Através do material dado em aula e pesquisas em livros e internet, cite duas formas de evitarmos contaminação por:
 - a) *Salmonella*
 - b) *Shigella*
 - c) *Clostridium botulinum*
 - d) *Staphylococcus aureus*
 - e) *Bacillus cereus*
 - f) *Escherichia coli*

Aula 5 – Segurança do trabalho e de higiene em laboratório de microbiologia

Objetivos

Reconhecer a importância das normas de segurança e higiene em análises microbiológicas.

Reconhecer e utilizar corretamente os equipamentos de proteção individual.

Listar os métodos de preparo de material e amostras para as análises microbiológicas.

5.1 Normas de segurança do trabalho aplicado à microbiologia

Prezado aluno, quando entramos em um laboratório, seja ele qual for, devemos obedecer algumas normas de segurança. Quando esse laboratório é de análises microbiológicas essas normas devem eliminar ou minimizar os riscos de contaminação, não somente dos alimentos como também dos manipuladores, já que vimos que os alimentos podem estar contaminados com patógenos.

Os laboratórios de microbiologia estão permanentemente em contato com estes microrganismos e para que ocorra uma segurança tanto da análise como do manipulador, existem cuidados que vão desde a higiene pessoal até os chamados EPI's (Equipamentos de Proteção Individual) que veremos a seguir.

5.1.1 Higiene pessoal

A higiene pessoal é um parâmetro essencial para o manipulador, pois a má higiene pode influenciar um resultado.

Com relação à higiene pessoal, podemos listar algumas observações, como:

- Lavar as mãos antes e depois de terminar uma análise microbiológica, pois, como dito anteriormente, uma má higienização das mãos pode estar influenciando em um resultado, a figura abaixo mostra as etapas da correta higienização das mãos.



Figura 5.1: Lavagem correta das mãos

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: Cartilha Boas Práticas para Serviço de Alimentação, RDC 216 de 2004.

- Não fumar, comer ou beber líquidos durante o trabalho.
- Não utilizar esmaltes e ter as unhas sempre curtas, pois, dessa forma, evita-se a contaminação e facilita a identificação da necessidade ou não de higienização.
- Não tocar nas mucosas (olhos, boca, nariz) durante o trabalho, pois como você já viu (Aula 4), este é um local que pode ser rico na bactéria *Staphylococcus aureus*.
- Utilizar jalecos sempre e preferencialmente de cor clara.

5.1.2 Equipamento de Proteção Individual (EPI)

Os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) são dispositivos de uso pessoal, destinados à proteção da saúde e integridade física do trabalhador. O uso dos EPI no Brasil é regulamentado pela Norma Regulamentadora NR – 6 da Portaria 3214 de 1978, do Ministério do Trabalho e Emprego.



As instituições devem adquirir e oferecer os EPI novos, em condições de uso aos trabalhadores e sem nenhuma cobrança por seu uso.

Alguns EPI estão listados a seguir:

- Jalecos e/ou aventais.

- Luvas.
- Respiradores ou máscaras faciais.
- Touca.
- Óculos de segurança.
- Protetor auricular.
- Botas ou calçados fechados.

É importante deixar claro que estes são apenas alguns dos EPI existentes e que, dependendo do risco, os mesmos devem ser utilizados ou não.

Além da parte da higiene pessoal e da utilização dos EPI, para que uma análise microbiológica seja confiável, são necessários outros procedimentos como a preparação do material, que também é um item de segurança, e isso você verá mais detalhadamente a seguir.

5.2 Preparação de material de laboratório para análises microbiológicas

A preparação do material de laboratório para utilização em análises microbiológicas envolve todas as atividades necessárias para garantir que os frascos, os utensílios, os instrumentos e a vidraria destinados ao contato com as amostras se encontrem totalmente limpos, estéreis e isentos de resíduos químicos e orgânicos no momento das análises. Esse trabalho envolve as atividades de lavagem de vidrarias e utensílios, esterilização ou desinfecção dos materiais, acondicionamento e descarte dos resíduos (SILVA et al, 2010).

5.2.1 Lavagem de vidrarias e utensílios

A lavagem da vidraria e demais utensílios é uma etapa fundamental no preparo do material de laboratório, principalmente quanto à escolha dos detergentes e aos métodos de enxague, para remover os resíduos desses agentes (SILVA et al, 2010).

Somente a lavagem com água e detergente específico não são suficientes para termos um material estéril para análise microbiológica, portanto devemos partir agora para a etapa de esterilização ou desinfecção.

5.2.2 Processo de esterilização e desinfecção

Primeiramente devemos diferenciar esterilização de desinfecção! Para tanto, observe as definições a seguir.

Esterilização: é a eliminação ou destruição completa de todas as formas de vida microbiana, através de processos físicos ou químicos.

Desinfecção: é o processo que elimina todos os microrganismos ou objetos inanimados patológicos, com exceção dos endósporos bacterianos, que são as formas mais resistentes, conforme já visto.

No sentido de impedir a contaminação das culturas microbianas com que se pretendem desenvolver os trabalhos práticos de microbiologia, deve-se proceder com a desinfecção e a esterilização dos objetos necessários e do ambiente. As formas mais comuns de desinfecção e de esterilização são divididas em agentes químicos e físicos, como você pode observar na descrição a seguir:

- **Agentes físicos**

Esse tipo de agente utiliza grandezas físicas para a esterilização ou desinfecção, podendo ser divididos em calor úmido, calor seco e radiação.

A-Z

Autoclave

É um aparelho utilizado para esterilizar materiais através do calor úmido sob pressão. Esse aparelho foi inventado pelo auxiliar de Louis Pasteur e inventor Charles Chamberland.

- **Calor úmido:** Grande parte do material e dos meios de cultura é esterilizada pelo calor úmido, porém há meios que são sensíveis ao calor e devem ser esterilizados por filtração ou simplesmente fervidos. A forma de esterilização mais utilizada é em **autoclaves**, operando com o binômio tempo/temperatura de 15min/121°C (SILVA et al, 2010).



Figura 5.2: Autoclave: (a) Cilindro de metal resistente com a resistência; (b) Tampa com parafusos de orelha; (c) Válvula de segurança e de ar; (d) Chave para controle da temperatura; (e) Registro de Temperatura e pressão; (f) Chave de potência.

Fonte: <<http://www.micologiaemfoco.com/2012/05/autoclave-como-usar.html>>. Acesso em: 27 ago. 2012.

- **Calor seco:** a esterilização pelo calor seco pode ser alcançada pela utilização de estufas com circulação de ar quente. As estufas de ar quente atingem temperaturas da ordem de 160-180°C. Como o poder de penetração do calor seco é baixo, esse método só deve ser utilizado quando o contato com o vapor é inadequado, como em materiais de vidro, por exemplo (CASAL et al, 2004).
- **Radiação:** radiação eletromagnética é a energia na forma de ondas eletromagnéticas transmitidas através do espaço ou através de um material (PELCZAR et al, 2009). As radiações são muito úteis para a esterilização de espaços, de salas, de instrumentos e de materiais que não suportam as temperaturas exigidas pelas técnicas do calor. A irradiação ultravioleta tem efeito microbicida se for utilizada com intensidade e tempo de exposição suficiente, encontrando aplicações diversas como na esterilização do ar, superfícies de equipamentos e em embalagens de alimentos (CARDOSO, 2007).



Microbicida consiste em qualquer substância ou processo que destrói os germes (bactérias, vírus ou outros micróbios que podem causar infecções ou doenças). Também chamado germicida.

- **Agentes químicos**

Como o próprio nome diz, esses agentes utilizam produtos químicos para a realização de esterilização ou desinfecção. A seguir veremos alguns agentes importantes.

- **Hipoclorito de sódio:** trata-se de um composto muito apropriado para a desinfecção de superfícies e de ambientes. A concentração mais comum para essa finalidade é a de 1% (p/v). Revela-se corrosivo para alguns metais e o contato não deve exceder 30 minutos. Após esse período deve proceder-se à lavagem e secagem das superfícies ou ambientes desinfetados (CASAL et al, 2004).
- **Álcoois:** o álcool etílico e isopropílico são normalmente utilizados para desinfecção de superfícies e antissepsia da pele. São compostos bactericidas de baixa potência. Não podem ser considerados como agentes de limpeza efetivos. Quando deixados por períodos prolongados em contato com a pele, tornam-se irritantes (CASAL et al, 2004). O álcool 93,8% tem um maior poder de volatilização, portanto para uma melhor ação bactericida, devemos diluir o álcool a 70%

Depois da lavagem e esterilização ou desinfecção, devemos proceder ao acondicionamento do material de forma que assegure a **NÃO** recontaminação.

5.2.3 Acondicionamento

Juntamente com esta etapa de acondicionamento dos materiais e utensílios, a seguir você irá saber quais os principais materiais utilizados nas análises através das Figuras 5.3, 5.4 e 5.5.

- **Placas de petri:** devem ser acondicionadas em estojos ou porta placas de alumínio ou aço inoxidável, em grupos de mesmo tamanho ou embrulhados em papel com, no máximo, 10 placas.

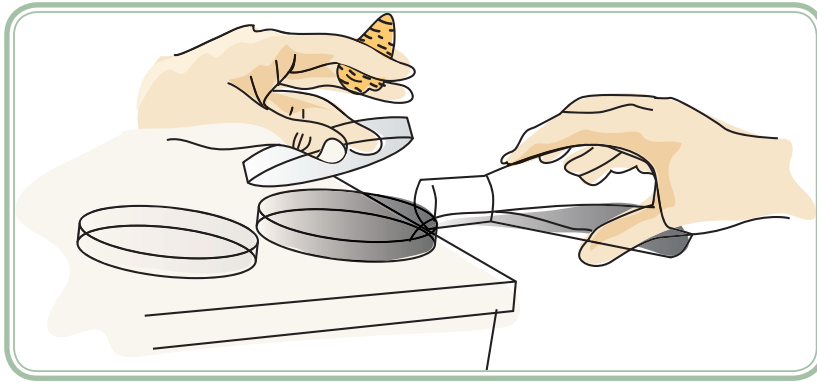


Figura 5.3: Distribuição do meio de cultura na placa de petri

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <[http://oficina.cienciaviva.pt/~pvi1235/menu_activades_alimentar.html](http://oficina.cienciaviva.pt/~pvi1235/menu_actividades_alimentar.html)>. Acesso em: 27 ago. 2012.

- **Pipetas:** preencher o bocal com algodão e acondicionar em porta pipetas de alumínio ou aço inoxidável, em grupos de mesma capacidade, com as pontas para baixo, na extremidade oposta à da tampa do estojo (SILVA et al, 2010).



Figura 5.4: Pipetas

Fonte: <<http://portuguese.alibaba.com/product-gs/serological-pipettes-599027209.html>>. Acesso em: 12 set. 2012.

- **Tubos de ensaio vazios:** tampar com algodão ou com as respectivas tampas. Além disso, quando acondicionados em grupos, devem ficar em cestas apropriadas para esse fim (SILVA et al, 2010).

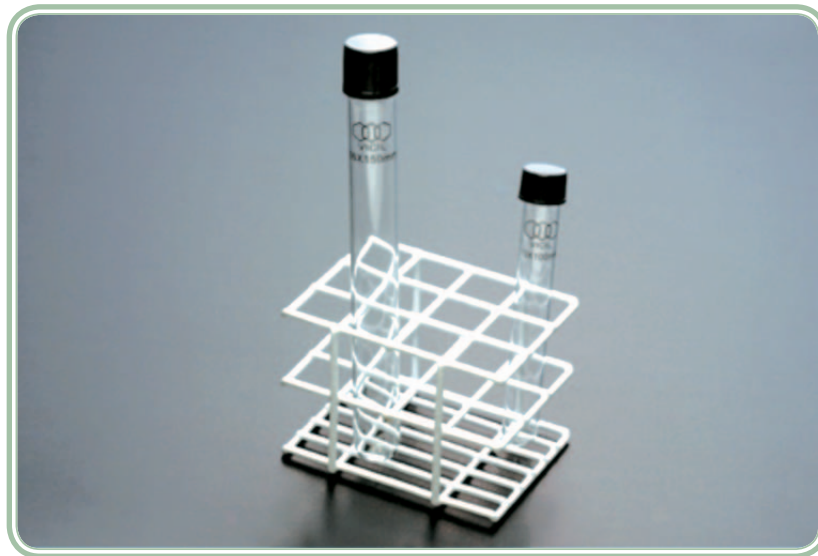


Figura 5.5: Tubos de ensaio

Fonte: <<http://www.casaamericana.com.br/index44eb.html?cPath=82&sort=2a&page=12>>. Acesso em: 12 set. 2012.

- **Espátulas, pinças, tesouras e demais utensílios:** embrulhar individualmente em papel Kraft, identificando a extremidade que só deve ser aberta no momento da análise (SILVA et al, 2010).



Papel Kraft é um tipo de papel fabricado a partir de uma mistura de fibras de celuloses curtas e longas, provenientes de polpas de madeiras macias. Esta mistura de fibras confere a esse tipo de papel características de resistência mecânica com bom desempenho para o seu processamento em máquinas e uma relativa maciez.

Com já falamos anteriormente, estamos trabalhando com possíveis patógenos, então, é necessário que ao fim do trabalho, as amostras sejam descartadas, porém antes devem haver uma etapa de descontaminação que veremos a seguir.

5.2.4 Descontaminação e descarte de resíduos contaminados

Devemos entender que todo o material resultante das análises microbiológicas é altamente contaminado, uma vez que os métodos analíticos promovem a multiplicação dos microrganismos presentes, elevando seu número em milhares de vezes. Esse material inclui não somente os **meios de cultura** onde foi obtido o crescimento microbiano, como também toda a vidraria e demais utensílios que tenham entrado em contato com os microrganismos (SILVA et al, 2010).

A-Z

Meio de cultura

Os meios de culturas são preparações químicas que possuem em sua formulação nutrientes necessários para que os microrganismos possam multiplicar-se permitindo seu estudo.

E como fazemos esta descontaminação para posterior descarte???

O material deve ser submetido à esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos, ou seja, utilizando uma forma de esterilização por meio físico, ou seja, utilizando calor úmido, conforme já vimos no item de esterilização ou desinfecção.

Outro parâmetro de segurança é com relação à coleta, transporte e estocagem das amostras para as análises que veremos a seguir.

5.3 Preparação de amostra para análises microbiológicas

A etapa de preparação das amostras que serão utilizadas nas análises microbiológicas são essências para a confiabilidade dos resultados. A seguir são listados esses parâmetros

5.3.1 Coleta de amostras para análise

Sempre que possível, as amostras de alimentos acondicionadas em embalagens individuais devem ser coletadas e encaminhadas ao laboratório em sua embalagem comercial original, fechada e intacta em quantidade nunca inferior a 100g ou 100 ml. No caso de alimentos contidos em tanques ou grandes embalagens, deve-se transferir porções representativas do conteúdo para frascos estéreis.

Deve-se proceder a limpeza e a desinfecção da embalagem do alimento a ser analisado, com solução de álcool iodado ou outro desinfetante.

Todas as informações como o método de coleta, horário, data devem ser anotados. Esses dados podem auxiliar na interpretação dos resultados.

Devemos ter muita atenção nesta etapa de coleta da amostra, pois a segurança do resultado pode estar focada neste item, pois, dependendo do erro, pode ocasionar um problema em um lote de produtos que poderão ser até mesmo rejeitados, dependendo do resultado apresentado.



5.3.2 Transporte e estocagem de amostras

Como regra geral, deve-se transportar e estocar amostras de alimentos da mesma forma como o produto é normalmente transportado e estocado na sua comercialização.

Alimentos comercialmente estéreis em embalagens herméticas podem ser transportados e estocados à temperatura ambiente, devendo ser protegido contra a exposição de temperaturas acima de 45°C (SILVA et al, 2010).

Alimentos com baixa atividade de água podem ser transportados e estocados à temperatura ambiente, protegidos contra a umidade (SILVA et al, 2010).

Resumo

Nesta aula, você estudou sobre a importância das normas de segurança e higiene em análises microbiológicas e pode verificar a importância do uso dos equipamentos de proteção individual. Além disso, aprendeu sobre os métodos de preparo de material e amostras para as análises microbiológicas.

Atividade de aprendizagem

1. A partir do que você estudou nesta aula, responda as questões que seguem. É importante salientar que para responder as questões você pode incluir outros itens além dos citados na apostila e consultar outros materiais de apoio que poderão ser disponibilizados os links nos fóruns.
 - a) Cite alguns itens de higiene pessoal obrigatórios para trabalho em laboratório de microbiologia (no mínimo 3).
 - b) Qual a importância da utilização de EPI's?
 - c) Por que a preparação de material é considerada uma etapa de segurança nas análises?
 - d) Diferencie esterilização de desinfecção.
 - e) Qual a função da autoclave?
 - f) Qual a importância da descontaminação antes do descarte de resíduos contaminados após as análises?

2. Marque V nas alternativas corretas ou F nas alternativas falsas.

- a) () Para utilização dos EPI's é permitida pelo empregador, a cobrança de taxa mínima dos funcionários.
- b) () Desinfecção é o processo que elimina todos os microrganismos, tornando o material estéril.
- c) () Utilização de autoclave é uma forma de esterilização por calor úmido.
- d) () A esterilização pelo calor seco pode ser alcançada pela utilização de estufas com circulação de ar quente.
- e) () Radiação eletromagnética é uma forma de esterilização por agente químico.
- f) () O acondicionamento dos materiais e utensílios é uma etapa desnecessária após a esterilização, já que em seguida o material já é utilizado.
- g) () Após o final de uma análise microbiológica, devemos descartar o material no lixo, sem problemas e o mais rápido possível.
- h) () A etapa de coleta da amostra é bem simples e não tem muita importância no resultado final de um laudo.
- i) () Alimentos comercialmente estéreis em embalagens herméticas podem ser transportados e estocados à temperatura ambiente, devendo ser protegido contra a exposição de temperaturas acima de 45°C.
- j) () Sempre que possível, amostras de alimentos acondicionadas em embalagens individuais devem ser coletadas e encaminhadas ao laboratório em sua embalagem comercial original.

Aula 6 – Análises microbiológicas

Objetivo

Identificar os princípios básicos dos principais métodos de análises microbiológicas.

6.1 Análises microbiológicas

Prezado aluno, depois de estudarmos algumas questões de higiene e segurança em laboratórios, assim como os cuidados na preparação de amostras e de materiais para análises, vamos estudar nesta aula as principais análises aplicadas aos laboratórios de microbiologia.

Analisar os alimentos para se verificar quais e quantos microrganismos estão presentes é fundamental para se conhecer as condições de higiene em que esse alimento foi preparado, os riscos que esse alimento pode oferecer à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida (FRANCO, 2008).

Os quatro métodos básicos utilizados para a determinação do número total de microrganismos são os seguintes:

1. Contagem Padrão em Placas (CPP).
2. Método do Número Mais Provável (NMP).
3. Técnica da redução de corantes para estimar o número de células viáveis, as quais possuem capacidade de redução.
4. Contagem por Microscopia Direta (CMD) tanto para **células viáveis** como não viáveis.



Células viáveis
Células capazes de se reproduzir.

A Figura 6.1 mostra um exemplo de placa de petri com ágar, contendo crescimento de microrganismos. Cada ponto representa um agrupamento de microrganismos (colônias).



Figura 6.1: Crescimento de microrganismos

Fonte: <http://ambientalge.blogspot.com.br/2010_08_01_archive.html>. Acesso em: 22 set. 2012.



Cada microrganismo terá um ágar e um método de análise específico para que possa ser identificado.

6.2 Contagem Padrão em Placas (CPP)

Este método consiste no plaqueamento de alíquotas do alimento homogeneizado e suas diluições em meios de cultura sólidos adequadamente selecionados em função do microrganismo a ser enumerado (FRANCO, 2008).

Certamente, o método de contagem padrão de placas é a mais utilizada nos laboratórios de análise de alimentos. Apesar da aparente simplicidade dessa técnica, ela pode ser bem trabalhosa quando muitas diluições precisam ser analisadas ou quando o número de amostras é grande.

A CPP determina o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC/g ou ml) em um produto alimentar (JAY, 2005).

UFC/g ou ml, unidade formadora de colônia, que representa os agrupamentos de microrganismo ou as colônias isoladas.



Ao realizar a análise microbiológica de um alimento, não sabemos a quantidade de microrganismos que estão presentes. Por esse motivo, antes de iniciar uma análise é necessária a realização de diluições, caso os microrganismos estejam presentes em grandes quantidades. Caso contrário, correremos o risco de não conseguir realizar a contagem desses microrganismos.

A técnica de contagem padrão de placas pode ser feita de duas formas, as quais serão descritas a seguir.

6.2.1 Plaqueamento em profundidade (POUR PLATE)

Essa técnica inicia-se com a realização da diluição, como comentamos anteriormente. Para a obtenção da diluição inicial ($1/10$ ou 10^{-1}), procede-se da seguinte forma:

- a) Retirar assepticamente porções de 25g ou 25ml da amostra e homogeneizar.
- b) Adicionar 225 ml do diluente escolhido (normalmente **água peptonada**).
- c) Preparar as diluições necessárias, $1/100$ ou 10^{-2} , $1/1000$ ou 10^{-3} , $1/10000$ ou 10^{-4} , a partir da diluição 10^{-1} , preparada anteriormente.

Retirar uma amostra assepticamente significa não ter interferentes do ambiente e do manipulador, ou seja o ambiente deve ser higienizado, assim com as mãos do manipulador.

Como fazer?

Transfere-se 1ml da diluição inicial para tubos de ensaio contendo 9 ml de solução peptonada, homogeneiza-se esta mistura (1ml da diluição mais os 9ml de água peptonada).

- a) Distribuir 1ml de cada diluição no centro de Placas de Petri estéreis, adicionando-se o Ágar em cima.
- b) Incubar as placas invertidas à 36°C por 48h



Água peptonada

É usada como meio de pré-enriquecimento para aumentar a recuperação de algumas espécies e é a solução utilizada para fazer a diluição das amostras.



A partir da Figura 6.2, podemos observar como funcionam estas diluições.

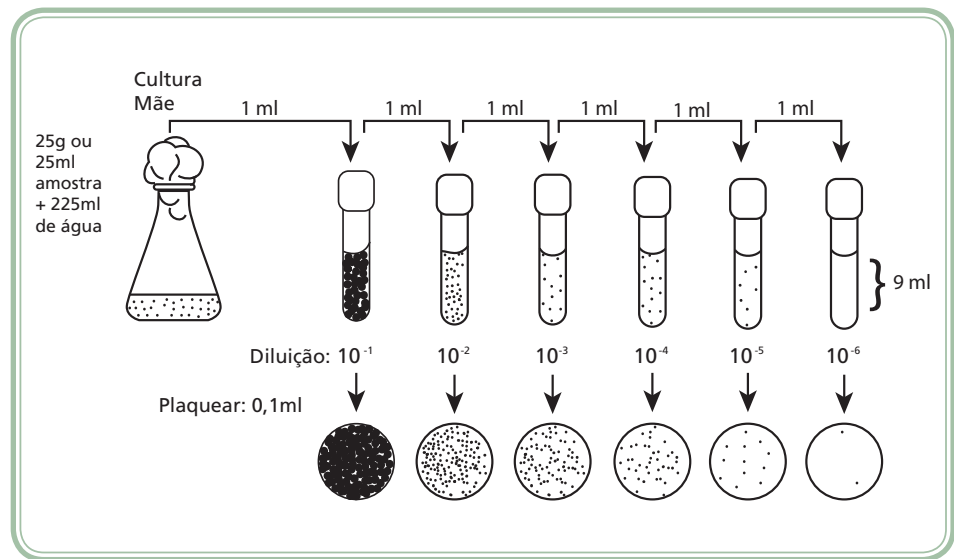


Figura 6.2: Placas com as diluições decimais

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap06/06-15_PlateCounts_1.jpg>. Acesso em: 05 set. 2013.

6.2.2 Plaqueamento em superfície ou espalhamento em placa (SPREAD PLATE)

A principal diferença entre os plaqueamentos em superfície e em profundidade é que no plaqueamento em superfície a amostra e/ou suas diluições são inoculadas diretamente em cima do meio já solidificado e distribuído nas placas de petri e no plaqueamento em profundidade a amostra e/ou diluições são inoculadas e posteriormente o meio, que, neste caso, fica por cima e está na fase líquida, sendo somente depois solidificado.

Na Figura 6.3 você pode observar um esboço dos dois métodos descritos anteriormente.

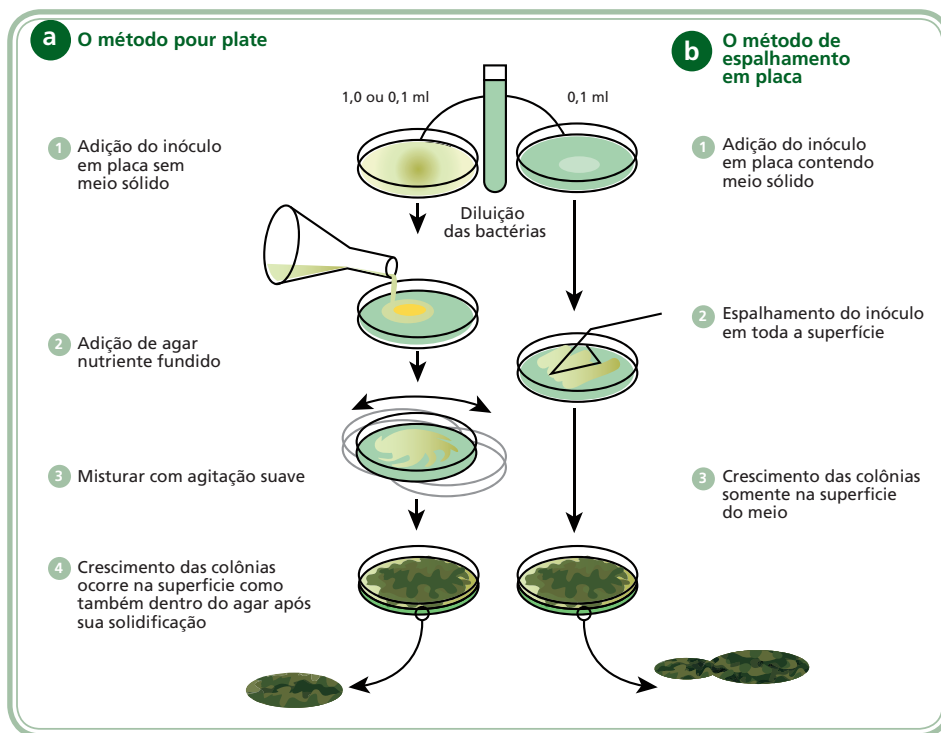


Figura 6.3: (a) Pour Plate; (b) Spread Plate

Fonte: Ilustrado por Amanda Duarte. Adaptado de: <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap06/06-16_PlateMethods_1.jpg>. Acesso em: 05 set. 2013.

6.3 Método do Número Mais Provável (NMP)

Este método de análise quantitativa permite determinar o NMP (Número Mais Provável) dos microrganismos alvos da amostra, baseada no princípio de que subdividindo a amostra em alíquotas algumas delas vão conter microrganismos e outras não. O número de alíquotas com microrganismos (tubos com crescimento positivo) e alíquotas sem microrganismo (tubos com crescimento negativo) permite estimar, a densidade original de microrganismos na amostra (SILVA, 2010).

Também chamada de técnica de tubos múltiplos é uma maneira bastante utilizada em laboratórios de microbiologia para estimar a contagem de alguns tipos de microrganismos como coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

O produto é submetido a três diluições decimais, conforme já explicado no item anterior e demonstrado na Figura 6.2. Cada uma dessas diluições é transferida, em porções iguais, para três tubos com um meio de cultura escolhido contendo um tubo de Durham. Os positivos serão identificados através da presença de gás formado no **Tubo de Durham**, conforme Figura 6.4.

A-Z

Tubos Durham

São utilizados em microbiologia para detectar a produção de gás por microrganismos. Eles são, simplesmente, pequenos tubos de ensaio inserido de cabeça para baixo em outro tubo de ensaio.

Para obtenção dos resultados desse método são utilizadas tabelas específicas.

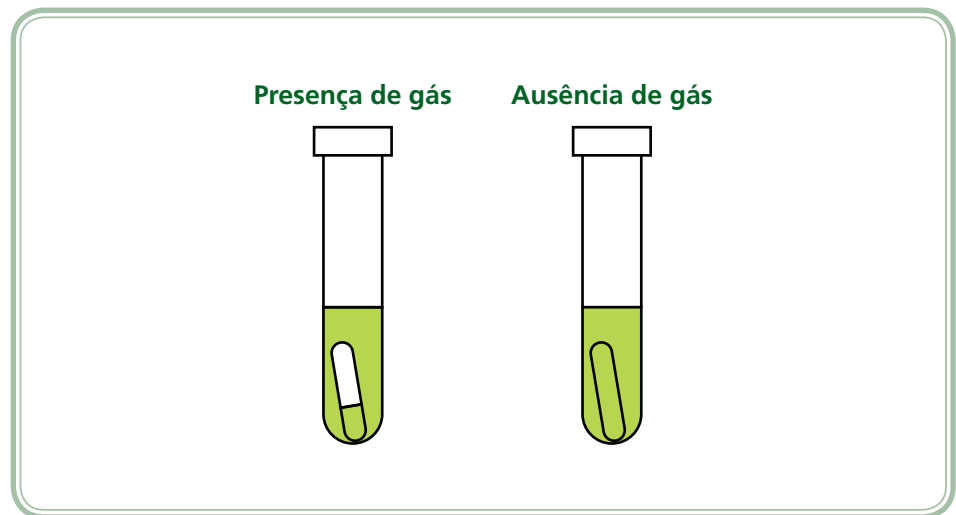


Figura 6.4: Ilustração do Tubo de Durham dentro de tubo de ensaio, com e sem formação de gás

6.4 Técnica da redução de corantes para estimar o número de células viáveis, as quais possuem capacidade de redução

Dois corantes são geralmente utilizados neste procedimento para estimar o número de organismos viáveis em um produto: azul de metileno e de resazurina. Para realizar um teste de redução de corante, sobrenadantes de alimentos apropriadamente preparados são adicionados a uma solução padrão dos corantes. A redução do azul de metileno (de azul para branco) e da resazurina (de azul para rosa ou branco) é inversamente proporcional ao número de organismos da amostra (JAY, 2005), ou seja, quanto maior a redução, maior a quantidade de microrganismos.



O teste de redução de corantes tem uma longa história de utilização na indústria de laticínios para estimar a qualidade de leite cru. Atualmente algumas de suas vantagens são: a simplicidade, a rapidez e o baixo custo, além disso, o fato de que somente células viáveis reduzem corantes.

6.5 Contagem por Microscopia Direta (CMD) tanto para células viáveis como não viáveis

Na sua forma mais simples, a Contagem por Microscopia Direta (CMD) consiste em fazer um esfregaço com a amostra de alimento sob uma lâmina de microscópio com um corante apropriado, visualizar e contar as células com o auxílio do microscópio. As CMD's são mais amplamente utilizadas em indústrias de laticínios para estimar a qualidade microbiológica de leite cru e de outros produtos lácteos. Este método possui, entre outras vantagens, a possibilidade de analisar a morfologia da célula (JAY, 2005).

Vale lembrar que existem inúmeras técnicas de análises microbiológicas em alimentos e para escolha do melhor método é necessário um grande conhecimento nessa área, que é bastante ampla!

Resumo

Nesta aula, você pode identificar os princípios básicos dos principais métodos de análises microbiológicas. Além disso, aprendeu sobre como realizar as diluições que são essenciais para alguns tipos de análises microbiológicas.

Atividade de aprendizagem

A partir do que você viu durante esta aula, selecione a opção correta.

1. A análise microbiológica dos alimentos é útil para:

- a) Determinar somente quais os microrganismos estão presentes nos alimentos, não sendo possível sua quantificação.
- b) Determinar a presença de microrganismos, assim como sua a quantidade, nos alimentos.
- c) Determinar somente a quantidade de microrganismos, não sendo possível a identificação de quais tipos são esses microrganismos

2. As diluições das amostras para proceder as análises microbiológicas têm a finalidade de:

- a) Conseguir realizar a contagem dos microrganismos, já que não sabemos em que quantidade eles se apresentam.
- b) Conseguirmos identificar o tipo de microrganismo.
- c) Saber se a bactéria é Gram positiva ou Gram negativa.

3. A Contagem Padrão em Placas (CPP) pode determinar:

- a) As unidades formadoras de colônias.
- b) O número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC/g ou ml).
- c) Apenas o número de células viáveis.

4. A Contagem Padrão em Placas (CPP) pode ser feita pelos métodos:

- a) Plaqueamento em profundidade (POUR PLATE) e plaqueamento em superfície ou espalhamento em placa (SPREAD PLATE).
- b) Plaqueamento em profundidade (POUR PLATE) e Número Mais Provável (NMP).
- c) Plaqueamento em superfície ou espalhamento em placa (SPREAD PLATE) e Contagem por Microscopia Direta (CMD).

5. Células viáveis são aquelas que são:

- a) Incapazes de se reproduzir.
- b) Capazes de formar gás.
- c) Capazes de se reproduzir.

6. A principal diferença do plaqueamento em superfície em relação ao plaqueamento em profundidade é:

- a) A amostra e/ou suas diluições são inoculadas diretamente em cima do meio já solidificado e distribuído nas placas de petri.
- b) A amostra é colocada em um ágar líquido.
- c) A amostra é colocada juntamente com ágar e depois se espera o mesmo solidifique.

7. A técnica do NMP (Número Mais Provável) é também chamada de:

- a) Técnica de espalhamento em superfície.
- b) Técnica de espalhamento em profundidade.
- c) Técnica de tubos múltiplos.

8. Tubos Durham são utilizados em microbiologia para:

- a) Detectar a presença de Salmonella.
- b) Detectar a produção de gás.
- c) Detectar a presença de água livre.

9. Algumas vantagens da Técnica de redução de corantes são:

- a) Simplicidade e alto custo, tornando-se mais confiável.
- b) Simplicidade, rapidez e baixo custo, além do fato de que somente células viáveis reduzem corantes.
- c) Simplicidade, rapidez e baixo custo, além do fato de que somente células não viáveis reduzem corantes.

10. O teste de redução de corantes tem uma longa história de utilização na indústria para estimar:

- a) Qualidade de carnes fermentadas.
- b) Qualidade de leite cru.
- c) Qualidade de bebidas de fruta.

11. Com a técnica de Contagem por Microscopia Direta (CMD), podemos também:

- a) Analisar a morfologia da célula.
- b) Analisar somente células viáveis.
- c) Analisar a faixa de atividade de água dos microrganismos.

12. Existem inúmeras técnicas de análises microbiológicas em alimentos, para a escolha do melhor método é necessário:

- a) Um grande conhecimento nesta área, que é bastante ampla.
- b) Apenas saber o básico, pois os microrganismos podem ser facilmente visíveis ao olho nu.
- c) Escolher a técnica mais fácil e barata, independente da confiabilidade.

Referências

BOSSOLAN, Nelma Segnini. **Introdução a Microbiologia**. São Paulo: Insituto de física de São Carlos, 2002. (Apostila).

CARDOSO, C. F. **Avaliação da esterilização de filme de polietileno com peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CASAL, M. et al. **Métodos convencionais em microbiologia**. Unidade I. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2241/1/U1.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GAVA, A. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 1984.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

INGRAHAM, JOHN L.; INGRAHAM, CATHERINE A. **Introdução à microbiologia: uma abordagem baseada em estudos de caso**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 2005.

LINGRAHAM, John; CATHERINE, A. Ingraham. **Introdução à microbiologia: uma abordagem baseada em estudos de caso**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. **Brock, Biology of microorganisms**. 10. ed. New Jersey, E.U.A: Editora Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, 2003.

MICHAEL, T. et al. **Brock, Biology of microorganisms**. 10. ed. New Jersey: Pearson Education, 2003.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2009. v 1.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiologica de alimentos e água**. São Paulo: Varela, 2010.

VECHIATTO, C. H. et al. **Biologia**. 2. ed. Paraná: Ícone Audiovisual, 2006. 296 p.

Currículo do Professor-autor

Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Fundação Universidade Federal de Rio Grande – FURG (2005). Mestrado e doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas – UFPel (2009 e 2012, respectivamente). Atualmente, é professora da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), tem experiência na área de Frutas e Hortaliças, especialmente em cromatografia líquida.





e-Tec^{rede}
Brasjl

