



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE VISEU



Sebenta Prática de Microbiologia Enológica

**Curso Técnico Superior Profissional
em Viticultura e Enologia**

**António Pinto
2019**

Introdução

A Microbiologia, como ciência independente, utiliza um conjunto de métodos próprios, destinados a quantificar os microrganismos presentes num determinado substrato. Tais métodos, revelam-se de um interesse inestimável, pois permitem determinar e pesquisar determinados tipos de microrganismos com importância nos alimentos e noutros substratos, e consequentemente, averiguar da qualidade microbiológica e higiénica, em que esses alimentos são produzidos, processados, conservados e comercializados.

No presente trabalho, iremos apresentar os principais métodos de avaliação quantitativa de populações microbianas, também conhecidos por métodos de contagem, e apresentar os seus fundamentos, a sua natureza e a expressão dos seus resultados.

Métodos de Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas

Métodos Directos:

- *Método de Breed*
- *Métodos da Câmara de Contagem*
- *Método da Filtração*
- *Métodos Electrónicos (Coulter Counter)*

Fundamento:

Todos estes métodos, são designados de **directos**, por permitirem a contagem dos microrganismos directamente, todos utilizando o microscópio fotónico para executar a contagem, à excepção do método de Coulter Counter.

Natureza:

Quanto à natureza dos resultados, estes métodos, classificam-se de métodos de **contagens de totais**, isto é, permitem a avaliação de todos os microrganismos presentes na amostra (**viáveis e não viáveis**), já que, pela sua natureza e execução, não é possível distinguir os microrganismos vivos dos mortos.

Expressão:

Os resultados, de todos estes métodos, exprimem-se pelo **número** de microrganismos por um determinado volume de substrato (N/ml).

Métodos Culturais:

- *Método das Placas*
- *Método das Membranas Filtrantes*
- *Método do NMP (Método dos tubos múltiplos)*

Estes métodos, como o próprio nome sugere, implicam a cultura dos microrganismos, o seu crescimento e multiplicação durante um determinado período de tempo (tempo de incubação), após o qual, se procede à contagem das colónias formadas, ou de outras manifestações do crescimento, como por exemplo, a produção de ácido e/ou de gás. São portanto métodos indirectos.

Fundamento:

Estes métodos fundamentam-se no facto de uma determinada quantidade de amostra, ao ser inoculada em determinadas condições, num meio de cultura, os microrganismos nela presentes, ficarão separados uns dos outros, individualmente, e por consequência, se presumir que as colónias resultantes, são originadas a partir da multiplicação de uma só célula (método das placas e método da membranas filtrantes). No caso do método do NMP (Número Mais Provável), o resultado é determinado em função do número de tubos positivos (formação de ácido ou de gás), obtidos nos ensaios experimentais.

Natureza:

Estes métodos, ao implicarem crescimento dos microrganismos, apenas contabilizam os microrganismos capazes de crescer (**viáveis**) e por isso são considerados métodos de contagem de **viáveis**. Atente-se que, presumivelmente, estes métodos apenas contabilizam dentro dos microrganismos viáveis, eventualmente, existentes no alimento ou noutro substrato, aqueles, que, possuam capacidade de crescimento nos meios de cultura e nas condições ambientais impostas por cada método.

Expressão:

Todos estes métodos, tal como os métodos directos, exprimem-se pelo número de microrganismos por um determinado volume de alimento. Normalmente (N/ml), se o alimento for líquido, ou (N/g), se o alimento for sólido. No caso do método das placas é corrente e mais rigoroso, expressar-se os resultados em UFC/ml ou UFC/g (UFC = unidades formadoras de colónias).

Métodos Indirectos ou de Quantitativos totais

- *Métodos turbidimétricos*
- *Métodos de medição de actividade*

Nestes métodos não se avaliam quantitativamente as células individuais, mas, pelo contrário, medem-se algumas características globais da população (exp: turvação e actividade). Têm a vantagem de serem métodos rápidos e a desvantagem de estarem limitados a avaliações comparativas em condições previamente fixadas.

Dentro dos métodos de medição da actividade, encontra-se o método da redução de corantes (redução do azul de metileno e redução da resazurina) com importância na avaliação da qualidade microbiológica dos leites. Estes métodos não têm aplicação na microbiologia enológica.

Trabalho Prático

Nº 1

Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas

(Método de Breed)

(Com pouco ou nenhum interesse em mostos e vinhos)

Objectivos:

- *Conhecer e executar o método de Breed.*
- *Compreender os seus fundamentos teóricos, a sua natureza e a expressão dos resultados.*
- *Aplicar o método ao leite e ao iogurte.*

Introdução

Este método de contagem directa, foi idealizado para a avaliação do número de bactérias do leite. Embora se possa aplicar na avaliação total de bactérias de outros substratos, nomeadamente, iogurtes, suspensões bacterianas, ou até em amostras de solo, é no leite que este método continua a ter uma aplicação generalizada.

O leite cru, isto é, acabado de ordenhar e antes de ser sujeito a qualquer tratamento térmico, constitui um óptimo meio de cultura para o crescimento de diversos tipos de microrganismos, em especial bactérias, pelo que o número total de bactérias presentes, após a ordenha, constitui um importante parâmetro de avaliação, quer da sua qualidade microbiológica, quer das condições de higiene das instalações da sala de ordenha, quer dos recipientes de recolha e transporte.

O método de Breed, por ser expedito, rápido e suficientemente rigoroso, fornece resultados imediatos e permite classificar os diversos lotes de leite, em diversas categorias de qualidade, de acordo com a carga bacteriana que possuem.

Material

- Balão com amostra de leite
- Pipetas de Breed (ou micropipeta de volume adequada)
- Escantilhão de Breed
- Lâminas
- Ansas e agulhas
- Pinças
- Bico de Bunsen
- Azul-de-metileno
- Álcool etílico a 95 %
- Xilol
- Tinas
- Óleo de imersão
- Microscópio fotónico

Procedimento

-Prepare uma lâmina, bem limpa e desengordurada e coloque-a em cima do escantilhão de Breed.

- Homogeneíze muito bem, a amostra de leite, agitando o balão onde este se encontra.

- Retire assepticamente, com o auxílio da pipeta de Breed ou de uma micropipeta 0,01 ml de leite e deposite-o, cuidadosamente, em cima da lamina.

- Com a ansa esterilizada e arrefecida, espalhe cuidadosamente, a amostra do leite, de forma a não ultrapassar os limites da quadrícula de 1 cm de lado, inscrita no escantilhão.

- Com o auxílio de uma pinça, coloque a lâmina, com a amostra do leite voltada para cima e seque-a à chama do bico de Bunsen, numa posição em que suporte perfeitamente o calor. (Esta secagem deve ser demorada e gradual para que o esfregaço não estilhace.)

- Depois de seco, desengordure o esfregaço, colocando a lâmina no interior da tina que contém xilol, durante 1-2 minutos.

- Fixe o esfregaço, mergulhando a lâmina em álcool etílico, durante 1 minuto. A fixação pode também ser feita pelo calor, passando três vezes a lâmina pelo interior da chama do bico de Bunsen, mas no caso do leite não se aconselha, devido aos elevados teores de gordura.

- Inunde o esfregaço com azul-de-metileno a 1% e deixe actuar durante 5 minutos.

- Deite fora o excesso de corante e lave cuidadosamente com água.

- Absorva o excesso de água com papel absorvente e acabe a secagem à chama do bico de Bunsen.

- Observe ao microscópio e conte as bactérias e/ou agrupamentos de bactérias que observa em cada campo microscópio.

- Deve contar de 25 a 50 campos.

- Registe o número de bactérias contadas em cada campo.

Cálculos

Para determinar o número de bactérias existente por ml de leite, precisa de calcular a área do campo, dado pela objectiva x100.

A área do campo = $3,14 \times r^2$, em que 3,14 é o valor de π e r o valor do raio, que no caso dos microscópios que possui é de 0,09 mm. Deve verificar estes valores.

Então a área do campo da objectiva x 100 = **0,025 mm²**

A área total da preparação é de 1 cm² ou seja **100 mm²**. Então na preparação que ocupa uma área de 100 mm² é possível observar 100/0,025 ou seja 4000 campos microscópicos.

Assim, sendo **n** (número médio de bactérias contadas por campo), o número total de bactérias existentes na área de 1cm² é de **n x 4000**.

Como na área de 1cm² se colocou 0,01 ml de leite significa que (**n x 4000**) representa o número de bactérias existentes em 0,01 ml de leite.

Logo **N / ml** (número de bactérias por ml de leite) = n x 4000 x 100 ou seja:

$$\mathbf{N/ml = n \times 400000}$$

Costuma designar-se o número 400000, como o factor do microscópio e que depende, obviamente, das características do microscópio, nomeadamente, do diâmetro de campo das objectivas. Este factor está de acordo com os microscópios fotónicos, em uso no laboratório. Se a amostra utilizada for recolhida de uma diluição prévia do substrato, claro que na fórmula anterior terá que se ter em conta, o factor de diluição (fd). Assim, a fórmula anterior tomará a seguinte forma:

$$\mathbf{N/ml = n \times 400000 \times 1/fd}$$

Bibliografia: Baseado na NP-460: 1985.

Trabalho Prático

Nº2

Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas

(Método das Câmaras de Contagem)

Objectivos:

- *Execução de uma suspensão microbiana.*
- *Execução do método das câmaras de contagem.*
- *Compreensão dos fundamentos, natureza e expressão dos resultados do método.*

Introdução

O método das câmaras de contagem tem a vantagem de ser expedito, rápido, económico e preciso. Este método, avalia por contagem directa, o número de células vivas e mortas, pelo que é considerado um método de contagem de totais, tal como o método de Breed. A sua aplicação é restrita à avaliação quantitativa de populações elevadas de microrganismos, nomeadamente, bactérias e leveduras. Tal como o método de Breed, este método utiliza o microscópio fotónico, que através de uma ampliação adequada, permite a contagem rápida e directa dos microrganismos.

As câmaras de contagem são dispositivos em vidro, standartizados, que possuem uma área escavada, onde está gravado um reticulado constituído por quadrículas de dimensões diferentes, mas rigorosamente conhecidas.

O reticulado padrão é constituído, nas suas maiores dimensões por um quadrado com 3 mm de lado. Este quadrado, encontra-se dividido em quadrados mais pequenos, possuindo cada um, 1 mm de lado, num total de nove quadrados. Cada um destes quadrados denomina-se **divisão**. Cada uma destas divisões é, por sua vez, subdividida horizontalmente, em quadrículas mais pequenas, cada uma tendo a forma de um rectângulo com 0,25 mm por 1mm. As três divisões centrais, são também divididas, perpendicularmente, definindo-se nas três divisões centrais, quadrículas em forma de quadrado com 0,25 mm de lado. Cada rectângulo e cada quadrado, assim definido, denominam-se **subdivisões de 1ª Ordem**. Por fim, na divisão central, cada quadrado de 0,25 mm de lado está dividido em 25 quadrados mais pequenos, tendo cada um, as dimensões de 0,05 mm de lado. Estes quadrados de 0,05 mm de lado denominam-se **subdivisões de 2ª Ordem**.

Tipos de Câmaras de Contagem

Existem dois tipos de câmaras de contagem. As câmaras de **Petroff-Hausser** e as câmaras de **Neubauer**. Ambas possuem constituição e reticulados idênticos, apenas diferem na profundidade. As câmaras de Neubauer possuem uma profundidade (distância na vertical entre o fundo e a parte inferior da lamela) de 0,1 mm, e por isso utilizadas na contagem de leveduras. As câmaras de Petroff-Hausser, por seu turno, possuem uma profundidade mais

reduzida, igual a 1/5 da profundidade das câmaras de Neubauer, ou seja de 0,02 mm. As câmaras de Petroff-Hausser são, por isso mesmo, destinadas à contagem de bactérias.

Determinação do número de leveduras numa suspensão, ou numa determinada fase de uma fermentação alcoólica (avaliação do número de leveduras por grama do liofilizado de leveduras comerciais (LSA) e monitorização do processo de vinificação).

Material

- Leveduras secas activas (LSA)
- Microscópio fotónico composto
- Amostra retirada de uma fermentação alcoólica em curso
- Câmaras de Neubauer
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas de Pasteur
- Tetinas
- Tubos de ensaio com 9 ml de água destilada ou solução de Ringer e esterilizada
- Bico de Bunsen
- Vortex

Procedimento

- Prepare uma suspensão a partir das leveduras fornecidas. Utilize leveduras secas activas (LSA). Para isso, pese assepticamente 1 g de LSA e com os cuidados necessários coloque num tubo de ensaio contendo 9 ml de água ou de solução de Ringer esterilizadas. Neste tubo obtém a diluição 10^{-1} .

- Prepare a câmara de Neubauer. Esta deve estar perfeitamente seca e limpa. Coloque-a em posição adequada e coloque cuidadosamente a lamela.

- Execute, correctamente, o enchimento da câmara. Para isso, depois de homogeneizar o tubo que contém a suspensão por agitação no vortex ou a amostra de mosto/vinho, retire uma determinada quantidade, com uma pipeta de Pasteur, e deposite uma gota entre a lamela e a câmara e verifique que esta fica totalmente preenchida com a suspensão.

- Coloque, cuidadosamente, a câmara na platina do microscópio e foque correctamente com a objectiva x10. Faça as regulações necessárias à obtenção de uma imagem bem focada e correctamente iluminada.

- Antes de proceder à contagem, escolha a malha estatística. Entende-se por malha estatística, a quadrícula ou associações de quadrículas, cujas áreas contenham entre 10 e 20 células.

- Definida a malha estatística, conte o número de leveduras em cada uma, de 25 a 50 malhas estatísticas, (para maior rapidez conte em 10 malhas) anote esses números, percorrendo os dois lados da câmara. A contagem faz-se com a objectiva x40.

- Durante a contagem irá debater-se com um problema. Como contabilizar as células que ficaram colocadas em cima dos riscos que delimitam as malhas definidas? Uma forma a seguir, é considerar os microrganismos colocados, por exemplo, no risco de cima e da direita de cada malha, como pertencentes a essa malha. Seguir sempre este critério em todas as malhas contadas. Daqui resulta, obviamente, que os microrganismos colocados nos riscos inferior e esquerdo da malha não são incluídos nessa malha.

- No final da contagem lave cuidadosamente a câmara e a lamela em água corrente, coloque a escorrer e guarde-as depois de secas.

- No caso da suspensão com LSA contiver um número exagerado de células, prossiga as diluições e execute as necessárias para obter um número contável adequado.

Cálculos

Após a contagem das malhas definidas, metade em cada uma das partes da câmara, faça a média aritmética, obtendo assim o número médio de leveduras existentes no volume definido pela malha.

Seja **n**, esse número médio.

Seja **V**, o volume definido pela malha. **V (mm³)= área da malha x p**, com p = 0,1mm.

Então, o número de leveduras por ml (**N/ml**), será:

$$\mathbf{N/ml = (n \times 1000) / V}$$

Se a contagem for executada numa determinada diluição, o número encontrado pela fórmula anterior, deverá ser multiplicado pelo inverso da diluição onde se fez a contagem.

Trabalho Prático

Nº 3

Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas

(Método das Placas)

Objectivos:

- *Execução de diluições decimais.*
- *Execução de sementeiras por incorporação e por espalhamento à superfície.*
- *Compreensão dos fundamentos, natureza e expressão dos resultados.*

Introdução

O método das placas tem uma generalizada aplicação nas indústrias agro-alimentares, pois permite, com resultados bastante fiáveis, a determinação da carga microbiana dos alimentos, quer sólidos, quer líquidos, dando indicações muito precisas acerca da sua qualidade microbiológica.

Trata-se de um método cultural e indirecto, que avalia o número de microrganismos viáveis, existentes no alimento. Uma amostra quantificada do alimento é, adequadamente, diluída e, de cada uma das diluições efectuadas, inocula-se uma determinada quantidade de inóculo para uma placa de Petri esterilizada, através de uma das seguintes técnicas de sementeira: sementeira por incorporação, sementeira por espalhamento à superfície ou sementeira por inundação.

O método das placas é de realização fácil, pode ser adaptado à quantificação de populações microbianas de qualquer grandeza e de outros substratos, tendo ainda grande sensibilidade na determinação de pequenos números de microrganismos.

Ao tratar-se de um método cultural, implica o uso de meios de cultura e de condições de incubação, que permitam o crescimento de microrganismos, os quais irão formar colónias. Assim, de acordo com o meio de cultura utilizado e das condições de incubação utilizadas, este método permite quantificar diferentes tipos de microrganismos, nomeadamente bactérias, bolores e leveduras viáveis, assim como, diferentes tipos ecofisiológicos, em particular de bactérias (termófilas, mesófilas, psicrotróficas, esporuladas, aeróbias e anaeróbias estritas), que interesse quantificar.

Método das Placas:

Fundamento:

Este método baseia-se no princípio de que cada microrganismo viável inoculado, em determinadas condições, dará, no final do período de incubação, uma colónia isolada. Obviamente, que este princípio, fundamenta-se no pressuposto de que a suspensão - diluição de microrganismos seja homogénea e que não possua agregados de células.

Natureza:

Devido às suas características, este método determina apenas os microrganismos viáveis, eventualmente, existentes na amostra. E mais, só quantifica, aqueles microrganismos, que tenham capacidade de crescer no meio de cultura e nas condições de incubação utilizadas. Trata-se de um método de **contagem de viáveis**.

Expressão:

Contando o número de colónias, que se formaram nas placas inoculadas, com uma determinada diluição (devem eleger-se as placas que possuam um número de colónias entre 30 e 300) e conhecendo o factor da diluição que as originou, facilmente se determina o número de microrganismos viáveis, existentes por grama (alimento sólido) ou por ml (alimento líquido) ou por grama de solo, se aplicado a este substrato.

Como sabemos que determinados tipo de bactérias, têm tendência a formar agregados (estafilococos, estreptococos), as contagens resultantes serão mais baixas que o número de células individuais, pois cada um dos agregados formará apenas uma colónia. Por este motivo, é que os resultados obtidos por este método, se devem expressar pelo número de unidades formadoras de colónias (**UFC/ml ou UFC/g**). Assim, pode ser uma unidade formadora de colónias: uma célula, um agregado, um esporo, ou um pedaço de uma hifa, o que torna, esta expressão dos resultados, mais ajustada à natureza do método.

Aplicação do Método das Placas em Mostos/Vinhos, para a Determinação:

- Flora Microbiana Total.

-Leveduras Sacaromicas (do género *Saccharomyces*) e Não Sacaromicas (leveduras pertencentes a outros géneros).

- Bactérias Lácticas.

Soluções diluidoras e meios de cultura

Como, já foi referido, a execução do método das placas pressupõe a realização de diluições quantificadas do alimento que se pretende analisar. Para que isso seja possível, torna-se necessário a preparação de soluções diluidoras, adequadas a cada tipo de alimento ou substrato.

Qualquer que seja a solução diluidora utilizada, esta deve obedecer aos seguintes requisitos (NP 2079 de 1989):

- Solução estéril destinada à preparação da suspensão - mãe e diluições;
- Possuir uma composição química, que não prejudique o desenvolvimento da flora microbiana a analisar;
- Ser isotónica e possuir um pH neutro.

As soluções diluidoras mais correntemente utilizadas são:

Solução de Ringer a 1/4

Esta solução desidratada, encontra-se já preparada no comércio, sob a forma de drageias. Esta solução é particularmente indicada, para a execução de diluições de leites, produtos lácteos e outros alimentos.

Peptona - sal

Salvo indicação em contrário, esta solução pode-se aplicar, numa forma geral, a todos os produtos alimentícios. Apresenta a seguinte composição:

Peptona trípica de caseína.....	1 g
Cloreto de sódio.....	8,5 g
Água destilada.....	1000 ml

Água peptonada tamponada

Esta solução está particularmente indicada para a diluição de alimentos à base de ovos. Encontra-se já preparada no comércio e apresenta a seguinte composição:

Peptona.....	10 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Monohidrogenofosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....	9 g
Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4).....	1,5 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparação da solução de Ringer a 1/4

Como o objectivo do trabalho prático é a determinação dos microrganismos viáveis existentes ao longo da fermentação alcoólica (em amostras retiradas no início, meio e fim da fermentação alcoólica), interessa preparar a solução de Ringer, pelo que se irá preparar uma determinada quantidade desta solução:

Material

- Balão de 1000 ml vazio
- Água destilada
- Placa de aquecimento magnética
- Provetas
- Pipetas de 10 ml
- Tubos de ensaio de 16x160mm
- Distribuidor automático.

Procedimento:

- De acordo com o rótulo, verifica que para a obtenção de 500 ml de solução de Ringer, precisa de dissolver 1 drageia.
- Para a preparação de 250 ml, terá que utilizar meia drageia. Corte, com uma faca, cuidadosamente uma drageia em duas.
- Meça, com uma proveta, 250 ml de água destilada para o balão adequado e introduza a metade da drageia.
- Faça a dissolução com agitação e aqueça até à ebulição se for necessário.
- Distribua com o auxílio de uma pipeta de 10 ml ou com o distribuidor automático, rigorosamente, 9 ml para cada um dos tubos de ensaio de 16x160ml. (isto porque vamos utilizar diluições decimais.).
- Rolhe os tubos com tampas metálicas, ou com algodão cardado.
- Esteriliza-se, em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

Determinação da Flora Microbiana Total

- Preparação dos meios de cultura:

O meio de cultura que vamos utilizar, encontra-se já preparado comercialmente, com a denominação de *Plate Count Agar (PCA)*, da Merck, cuja composição é a seguinte:

PCA (g/L):

Peptona de caseína.....	5 g
Extracto de levedura.....	2,5 g
D-Glucose.....	1 g
Agar-Agar.....	14 g
Água destilada.....	1000 ml

Material

Utilize o material necessário e nas condições exigidas para a preparação dos meios de cultura desidratados, que já conhece.

Procedimento

- Prepare 500 ml, do meio de cultura indicado, pesando a quantidade necessária para tal volume, de acordo com as instruções do fabricante.
- Distribua o meio de cultura em volumes de 15 ml a 20 ml, em cada um dos tubos de ensaio fornecidos.
- Esterilize em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

Determinação de Leveduras *Saccharomyces* (do género *Saccharomyces*) e Não *Saccharomyces* (leveduras pertencentes a outros géneros).

- Preparação dos meios de cultura:

São vários os meios de cultura existentes no comércio, usados para a determinação de leveduras e bolores, nos diversos substratos ou amostras. Meios de cultura como o PDA (Patato Dextrose Agar), SABOURAUD, com ou sem antibiótico, para inibição de bactérias, YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol), já com o antibiótico incorporado, para inibição do crescimento bacteriano, são alguns exemplos.

No entanto, em microbiologia enológica convém, sempre que possível, determinar grupos cada vez mais específicos de microrganismos. Interessa neste caso saber como evoluem, ao longo da fermentação alcoólica, as populações de leveduras do grupo *Saccharomyces* das leveduras não *Saccharomyces*. Interessa então formular meios de cultura que privilegiem o crescimento de umas em detrimento de outras, de forma a imprimir selectividade.

Meios de cultura em que a fonte de azoto seja o aminoácido lisina, permitem só o crescimento das leveduras não – *Saccharomyces*, uma vez que as espécies de *Saccharomyces*, incluindo a *S. cerevisiae*, são incapazes de utilizar a lisina como fonte de azoto.

A tolerância ao álcool etílico e ao metabissulfito de sódio ou de potássio (sulfuroso), pode também ser utilizado para orientar a selectividade dos meios de cultura, quanto ao crescimento das leveduras *Saccharomyces* em relação às não – *Saccharomyces*. Assim, meios de cultura contendo 12% (120 ml/L) de álcool etílico e 0.015% (150 mg/L) de metabissulfito de sódio ou de potássio inibe ou prejudica o crescimento das leveduras não – *Saccharomyces*, devido à sua menor tolerância a estes compostos.

Para evitar o crescimento de Bolores, pode também juntar-se a estes meios, o antifúngico cycloexamida (actidione) à razão de 10 a 50 mg/L.

Para evitar o crescimento de bactérias, deve juntar-se ao meio o antibiótico oxytetracyclina à razão de 100 mg/L, ou outro antibiótico.

Assim para a determinação das leveduras não *Saccharomyces*, vamos preparar 500 ml de meio de cultura *Lisina Agar*, com a seguinte composição por litro:

Lisina Agar (g/L):

Lisina.....	10 g
Extracto de levedura.....	0.5 g
Glicose.....	10 g
Agar-Agar.....	20 g
Àgua destilada.....	1000 ml

Material

Utilize o material necessário e nas condições exigidas para a preparação dos meios de cultura desidratados, que já conhece.

Procedimento

- Prepare 500 ml, do meio de cultura indicado, pesando a quantidade necessária para tal, de cada um dos ingredientes. pH ajustado a 5.5.
- Esterilize em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.
- Distribua o meio de cultura, assepticamente, em placas de petri esterilizadas à razão de 15 ml a 20 ml, por placa.

Para a determinação das leveduras *Saccharomyces*, vamos preparar 500 ml de meio de cultura YGC (*Modificado*) com a seguinte composição por litro:

YGC (g/L):

Extracto de Levedura.....	5 g
Glicose.....	20 g
Chloramphenicol.....	0.1 g
Agar – Agar.....	15 g
Metabissulfito de potássio.....	150 mg
Álcool etílico absoluto.....	120 ml
Água destilada.....	880 ml

Em alternativa, iremos preparar para leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* os meios de cultura PDA (Patato Dextrose Agar), que já existe em formulações desidratadas comerciais), mas preferencialmente iremos preparar o meio de SABOURAUD, com Cloranfenicol, que tem a vantagem relativamente ao PDA, de inibir o crescimento de bactérias e permitir um crescimento abundante, tanto de leveduras do género *Saccharomyces* como dos outros géneros.

Material

Utilize o material necessário e nas condições exigidas para a preparação dos meios de cultura desidratados, que já conhece.

Procedimento

- Prepare 500 ml, do meio de cultura indicado, pesando a quantidade necessária para tal, de cada um dos ingredientes.
- Esterilize em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.
- Depois da esterilização, arrefeça em banho-maria a 50 °C, e junte o álcool etílico, misturando bem.
- Distribua o meio de cultura, assepticamente, em placas de petri esterilizadas à razão de 15 ml a 20 ml, por placa.

Para a determinação das bactérias lácticas, vamos usar o meio de cultura, já comercializado no comércio sob a forma de pó, designado MRS Agar (de Man, Rogosa e Sharpe). Este meio de cultura pode ser modificado com a incorporação de 20 % de sumo de tomate, ou de mosto, 0.2% de ácido L- málico e 100 mg/L de Actidione (Cycloexamida).
Composição por litro:

MRS (Modificado) (g/L):

Peptona de caseína.....	10 g
Extracto de carne.....	8 g
Extracto de levedura.....	4 g
Glicose	20 g
K ₂ H PO ₄	2 g
Tween 80	1 g
Citrato de amónio.....	2 g
Acetato de sódio	5 g
Sulfato de magnésio.....	0,2 g
Sulfato de manganês.....	0,04 g
Agar- agar.....	14 g
Actidione.....	100 mg
Sumo de tomate.....	200 ml
Água destilada-----	800 ml.

Material

Utilize o material necessário e nas condições exigidas para a preparação dos meios de cultura desidratados, que já conhece.

Procedimento

- Prepare 500 ml, do meio de cultura indicado, pesando a quantidade necessária para tal volume, de acordo com as instruções do fabricante.

- Distribua o meio de cultura em volumes de 15 ml a 20 ml, em cada um dos tubos de ensaio fornecidos.

- Esterilize em autoclave a 118°C, durante 15 minutos.

Execução das diluições decimais

- Identifique os tubos onde vai realizar as diluições.

- Homogeneíze, convenientemente a amostra de mosto/vinho fornecida, para obter uma perfeita distribuição dos microrganismos.

- Com os cuidados de assépsia que já conhece, pipetar 1 ml da amostra, depois de ter esvaziado e enchido a pipeta 3 a 5 vezes, para o primeiro tubo contendo 9 ml de solução de Ringer esterilizada.

- Homogeneíze cuidadosamente este tubo, utilizando o vortex, de modo que o turbilhão não atinja a bordadura do tubo. Pipetar com nova pipeta esterilizada, 1ml do 1º tubo e transfira-o para o segundo, sem que a ponta da pipeta toque na superfícies da solução.

- Proceda, sempre da mesma maneira, até executar todas as diluições pretendidas.

- No presente caso, executámos 7 diluições decimais: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

Na figura seguinte está representado a técnica das diluições decimais:

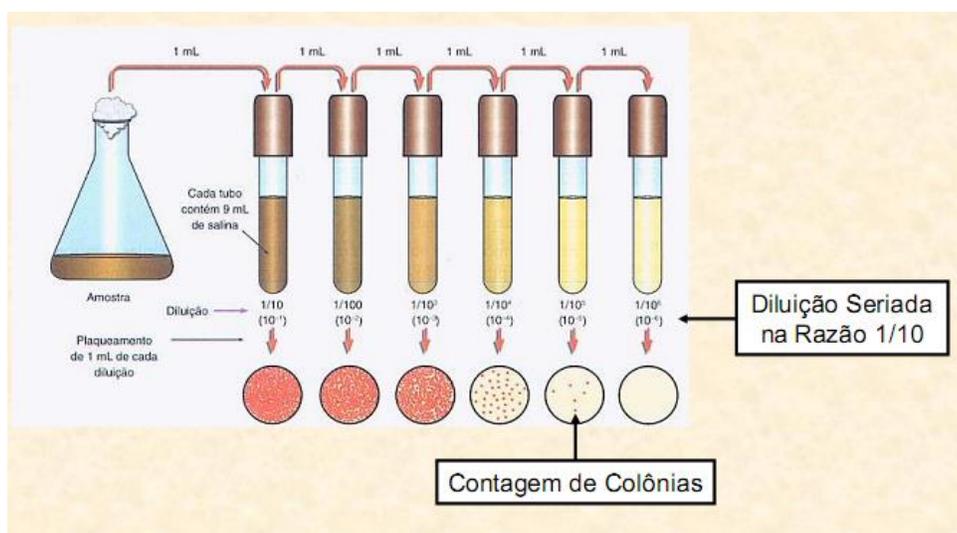


Figura: Técnica das diluições decimais.

Inoculação (sementeira)

- A técnica de sementeira que vamos utilizar, para a determinação da flora microbiana total e para a determinação das bactérias lácticas, denomina-se **sementeira por incorporação**. Na figura seguinte está representada a técnica de sementeira por incorporação:



Figura: Técnica de sementeira por incorporação.

- Outra técnica, utilizada para a determinação de bolores e leveduras, é a **sementeira por espalhamento à superfície**. Esta técnica, implica que as placas já contenham o meio de cultura solidificado, e, consiste em espalhar o inóculo, uniformemente, à superfície do meio de cultura, usando um espalhador de vidro esterilizado à chama e arrefecido.

Na figura seguinte está representada a técnica de sementeira por espalhamento à superfície:

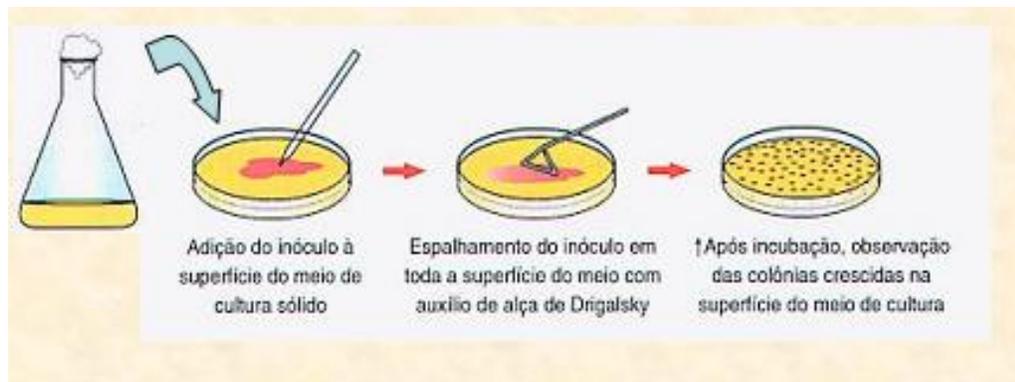


Figura: Técnica de sementeira por espalhamento à superfície.

Procedimento

- Com os cuidados de assépsia, transfira com uma pipeta estéril, 1ml da primeira diluição, para a placa de Petri estéril e vazia correspondente, não esquecendo de efectuar a sua homogeneização prévia. Proceda da mesma maneira para as várias diluições.

- Incorpore e misture ao inóculo de cada placa, os 15 ml do meio de cultura, fundido e arrefecido a 50 °C, vertendo de uma vez só no interior da placa. Execute cinco movimentos de rotação para a direita, cinco para a esquerda, cinco na horizontal e cinco na vertical, sem que o meio de cultura salte para a tampa da placa. Estes movimentos visam a distribuição homogénea dos microrganismos e a sua incorporação no meio de cultura.

- Deixe solidificar as placas em cima da bancada, o que acontece passados alguns poucos minutos.

Incubação

As placas de Petri, assim semeadas, são colocadas na estufa, à temperatura desejada (no caso, a 30 °C), durante 48 a 72 horas, em posição invertida.

Leitura e interpretação dos resultados

Após, o período de incubação, procede-se à contagem das colónias formadas. Escolhe-se para a contagem das colónias, a placa, correspondente à diluição, que originar entre 30 e 300 colónias. Esta, será a nossa diluição definidora.

Apresentação dos resultados

De acordo com as NPs, e para diminuir os erros estatísticos, devem-se inocular duas placas por cada diluição efectuada. Nós só inoculámos uma, apenas para economizar material, e porque este trabalho, tem apenas objectivos pedagógicos e didácticos.

a) Selecciona-se a diluição que provocou o aparecimento de uma ou duas placas, contendo entre 30 e 300 colónias.

b) Calcula-se a média do número de colónias contadas nessas placas.

c) Apenas se consideram dois algarismos significativos.

d) Para um número de 3 algarismos, arredonda-se ao zero mais próximo. Se o 3º algarismo for 5, arredonda-se ao zero inferior.

e) Multiplica-se este valor pelo inverso do factor da diluição correspondente, para se obter o número de microrganismos por mililitro ou por grama da amostra.

f) Expressa-se o resultado por um número compreendido entre 1,0 e 9,9, multiplicado por 10^n , sendo n a potência de 10 apropriada.

No caso de todas as placas semeadas não apresentarem colónias, os resultados apresentam-se da seguinte maneira:

- Alimentos líquidos: menos de 1 microrganismo por ml.

- Outros alimentos (Suspensão - mãe): menos de $1 \times n$ microrganismos por grama, sendo n o inverso do factor de diluição da suspensão mãe.

No caso das placas semeadas com a amostra (alimentos líquidos), ou com a suspensão-mãe (outros produtos), conterem menos de 30 colónias, o resultado apresenta-se da seguinte maneira:

- Alimentos líquidos: menos de 30 microrganismos por ml.

- Outros alimentos: menos de $30 \times n$ microrganismos por grama, sendo n o inverso do factor de diluição da suspensão-mãe.

No caso de todas as placas semeadas se encontrar um número de colónias superior a 300, o resultado apresenta-se assim:

- mais de $300 \times n$, microrganismos por ml ou por grama, sendo n o inverso do factor da diluição mais elevada, em que ocorreram as mais de 300 colónias.

Nota:

A **suspensão-mãe**, realiza-se para alimentos não líquidos e prepara-se colhendo, assepticamente, diversos pedacinhos de diferentes lugares do alimento, até perfazer uma amostra de tamanho adequado e representativa (normalmente 10 g).

Estas 10 g, introduzem-se, num balão ou num saco de plástico esterilizados contendo 90 ml de solução diluidora estéril. Homogeneiza-se muito bem, mecanicamente, o balão, ou mais modernamente, o saco, no Stomacker, durante 1 a 2 minutos, de forma a obter uma suspensão homogénea e capaz de ser pipetada.

A partir desta suspensão-mãe, realizam-se as outras diluições necessárias, procedendo-se do mesmo modo, como o explicado anteriormente, para os alimentos líquidos.

Iremos ter oportunidade de prepararmos uma suspensão-mãe, quando aplicarmos o método das placas a um alimento sólido (carne, salsichas frescas, fiambre ou saladas, por exemplo).

Recomendações:

Para um, eventual, melhor esclarecimento destes assuntos, recomendamos a leitura de:

- NP - 402 (1966) - Colheita de amostras de leite.
- NP - 403 (1983) - Leites: Preparação das amostras para análise.
- NP - 1828 (1982)- Colheita de amostras para análise microbiológica.
- NP - 1829 (1982)- Preparação da amostra para análise microbiológica.
- NP - 1995 (1982)- Regras gerais para contagem de microrganismos a 30 °C
- NP - 2079 (1989)- Regras gerais para análise microbiológica.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

PROTOCOLO Nº4

Sensibilidade das Leveduras ao Sulfuroso (SO₂)

Prepare uma solução de Sulfuroso a 5%. Para isso dissolva 10g de Metabissulfito de Sódio ou de Potássio em 100 ml de água destilada (Metabissulfito de Sódio ou de Potássio doseia 50% de sulfuroso).

Prepare séries de 9 tubos de ensaio (16x160), com 10 ml de mosto de uva a 50% (água destilada misturada com mosto de uva na proporção de 1:1), tantas quantas as necessárias para os isolamentos ou tipos de leveduras ou bactérias a ensaiar.

Dentro de cada tubo coloque em posição invertida um tubo de Durham, de forma a ficar cheio de mosto (tubo de fermentação).

Leve os tubos assim preparados e capsulados a esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

No final da esterilização e depois de arrefecidos transfira assepticamente, com uma micropipeta, respectivamente, 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µL, da solução sulfurosa a 5%, para cada um dos tubos com mosto. Agite no Vortex ligeiramente. Com estas quantidades de solução sulfurosa obtém-se, respectivamente: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 mg/L de sulfuroso (SO₂). Verifique.

Para sermos rigorosos, antes de introduzir as quantidades de solução sulfurosa referida, deve retirar primeiro a mesma quantidade de meio.

Inocule com uma suspensão de leveduras e/ou bactérias fornecidas, à razão de 10 µL, por tubo. Agite moderadamente ao vortex.

Identifique o material e coloque os tubos a incubar, numa estufa a 25 – 30 °C, durante 5 dias.

Observar os resultados, e exprimir quais as concentrações a partir das quais, o crescimento é inibido.

A inibição é traduzida pela falta de crescimento nos tubos (ausência de turvação e de produção de gás nos tubos de fermentação). Deve começar a observação dos tubos, após 24 ou 48 horas de incubação.

Verifique se houve ou não diferenças de sensibilidade/tolerâncias ao sulfuroso, entre os tipos de leveduras e de bactérias ensaiadas.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

PROTOCOLO Nº5

Sensibilidade das Leveduras ao Álcool (Etanol)

Prepare séries de 5 tubos de ensaio (16x160), com respectivamente, 10 ml de mosto de uva a 50% (água destilada misturada com mosto de uva na proporção de 1:1), 9.5, 9.0, 8.5 e 8.0 ml, tantas quantas as necessárias para os isolamentos ou tipos de leveduras a ensaiar.

Dentro de cada tubo coloque em posição invertida um tubo de Durham, de forma a ficar cheio de mosto (tubo de fermentação).

Leve os tubos assim preparados e capsulados a esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

No final da esterilização e depois de arrefecidos transfira assepticamente, com uma pipeta de 1 ml, respectivamente, 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ml de etanol absolutos para cada um dos tubos com mosto. Agite no Vortex ligeiramente. Com estas quantidades de etanol obtém-se concentrações de, respectivamente, 0, 5, 10, 15 e 20 % de etanol. Verifique.

Inocule com uma suspensão de leveduras fornecidas, à razão de 10 µL, por tubo. Agite moderadamente ao vortex.

Identifique correctamente os tubos e coloque-os a incubar a 25°C - 30°C, durante 2 a 5 dias. Deve começar a observação dos tubos, após 24 ou 48 horas de incubação.

No final da incubação registe os resultados, considerando tubos com crescimento aquele em que houver produção de gás no tubo de Durham e verifique se houve ou não diferenças de sensibilidade/tolerância ao etanol, entre os tipos de leveduras ensaiadas.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

PROTOCOLO Nº6

Imobilização de leveduras

(Leveduras encapsuladas em esferas de alginato)

A aplicação de leveduras imobilizadas, nos processos enológicos, começa a ter um grande interesse uma vez que traz vantagens relativamente à utilização comum. Uma das vantagens reside no facto de que as leveduras poderem ser utilizadas mais que uma vez, e conseguir-se parar o processo de uma forma muito prática, bastando para isso retirar as leveduras imobilizadas do processo. Já existem no mercado leveduras imobilizadas (encapsuladas) disponíveis para certos bioprocessos, como é o caso da espécie *Schizosaccharomyces pombe*, para a realização da fermentação malo-alcoólica.

Imobilização de leveduras secas activas (LSA), da espécie *S. cerevisiae*.

Material:

- Leveduras secas activas
- Alginato de sódio
- Cloreto de cálcio
- Balança
- Coador
- Água destilada esterilizada
- Copos de vidro
- Agitador
- Proveta

Procedimento:

- Num copo de vidro de capacidade adequada, dissolver o alginato de sódio em água destilada (0.5 a 1 g de alginato de sódio em 25 ml de água destilada). Agitar bem com uma vareta de vidro e se possível a quente (facilita a dissolução), até se obter um gel sem grumos. Deixar arrefecer.

- Suspender as leveduras secas activas, noutro copo de vidro, de capacidade adequada (2 g de leveduras secas +25 ml de água destilada). Homogeneizar e colocar numa estufa a 35 °C, para revitalizar as leveduras (reidratação), durante meia hora. A reidratação das leveduras secas activas deve ser realizada numa quantidade de água, correspondente a cerca 10 vezes o seu peso.
- Preparar uma solução de cloreto de cálcio de 1 a 2% (misturar num copo de vidro de 500 ml, 250 ml de água destilada + 2.5 g de cloreto de cálcio), para se obter uma solução a 1 %.
- Num copo de 100 ml, misturar a solução de alginato de sódio com a suspensão de leveduras e agitar bem.
- Com uma seringa de 10 ml, sem agulha, deixar cair gota a gota a mistura de alginato de sódio com as leveduras, na solução de cloreto de cálcio, mantendo o líquido com uma agitação suave.
- Coar as esferas, utilizando um coador, para as separar da solução de cloreto. Lavar as esferas em água destilada esterilizada.
- Para a sua utilização, na fermentação, juntar o número de esferas adequado ao volume do substrato (um número que na prática se recomenda é de cerca de um milhão de leveduras por mililitro de mosto). As leveduras encapsuladas (esferas) devem ser colocadas no fermentador em saquinhos de rede ou outro recipiente poroso.
- Fazer os cálculos adequados em função do número médio de leveduras ou do peso de leveduras secas activas (LSA) que ficarão por esfera.
- Concluída a fermentação, retirar as esferas e lavá-las em água destilada esterilizada. Conservar as esferas em frigorífico numa solução de cloreto de cálcio a 1 a 2 %. As leveduras imobilizadas sobrevivem bastante tempo nestas condições.

Cálculos: Estime por contagem o número total de esferas que consegue com os 50 ml da mistura que preparou. Represente esse número por **N**. Considere **P**, o peso (g) de LSA, que utilizou no processo. Então, dividindo **P** por **N** (P/N) determina o peso médio de LSA existente por esfera. Considerando que os fabricantes recomendam cerca de 20 g de LSA por hectolitro de mosto (100 L), calcule o número de esferas a utilizar por cada reactor, onde vai fermentar cerca de 1 L de mosto.

Na figura seguinte encontra-se representado a obtenção de esferas, numa solução de cloreto de cálcio.



Figura: Processo de obtenção de esferas de alginato de cálcio com as leveduras no seu interior.



Figura: Aspecto das esferas depois de coadas e lavadas.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

PROTOCOLO Nº7

Estimulação da Esporulação em Leveduras

A esporulação em leveduras, com a produção de esporos de natureza sexuada (ascósporos), é estimulada com a cultura em meios mínimos de glucose e pobres em nutrientes contendo acetato de potássio (Agar Acetato), após cultivo em meios de cultura ricos em nutrientes.

Agar – Acetato

Acetato de potássio - 10 g

Extracto de levedura – 2,5 g

Glicose – 1g

Agar – agar -20 g

Àgua destilada – 1L

Ajustar pH a 8. 4 Com hidróxido de sódio

Agar Googkowa

Glicose – 1g

Peptona – 10 g

NaCl – 5 g

Agar – agar -20 g

Àgua destilada – 1L

Ajustar pH 8. 4 Com hidróxido de sódio

Preparar estes meios de cultura, em quantidades adequadas, e distribuí-lo em tubos de ensaio à razão de 10 ml, de forma a obter uma cunha (agar inclinado).

Leve os tubos assim preparados e capsulados a esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

Inocule, assepticamente, por riscado à superfície, em zig- zag, os tubos contendo o meio de Agar - Acetato: Coloque os tubos a incubar, a 25-30°C, durante 5 dias, a duas semanas.

No final de incubação execute preparações a fresco e com a objectiva mais adequada observe a existência de esporos (número por asco e forma.)