

ROSÂNGELA UHRIG SALVATORI
GREICE ALINE KAISECAMP WOLF
FABÍOLA DRESCH
ANDREIA APARECIDA GUIMARÃES STROHSCHOEN

**LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA:
normas gerais, instruções de trabalho e
Procedimentos Operacionais Padrões (POP)**

Rosângela Uhrig Salvatori
Greice Aline Kaisekamp Wolf
Fabíola Dresch
Andreia AParecida Guimarães Strohschoen

Laboratório de Microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e Procedimentos Operacionais Padrões

1ª edição



Lajeado, 2013

Coordenação e revisão final: Ivete Maria Hammes

Editoração: Bruno Henrique Braun e Marlon Alceu Cristófoli

Capa: Bruno Henrique Braun

Avelino Tallini, 171 - Bairro Universitário - Cx. Postal 155 - CEP 95900-000,

Lajeado - RS, Brasil. Fone: (51) 3714-7024 / Fone/Fax: (51) 3714-7000

E-mail: editora@univates.br / <http://www.univates.br/editora>

S182 SALVATORI, ROSÂNGELA UHRIG

Laboratório de Microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e procedimentos operacionais padrões / Rosângela Uhrig Salvatori, Greice Aline Kaisekamp Wolf, Fabíola Dresch e Andreia Aparecida Guimarães Strohschoen - Lajeado: Ed. da Univates, 2012.

72 p.

ISBN 978-85-8167-044-7

1. Microbiologia 2. Manual de laboratório I. Título

CDU: 579(035)

Ficha catalográfica elaborada por Nalin Ferreira da Silveira CRB 10/2186

**Todos os textos são de exclusiva
responsabilidade das autoras.**

DADOS DAS AUTORAS

ANDREIA APARECIDA GUIMARÃES STROHSCHOEN

Possui graduação em Licenciatura em Ciências com habilitação Plena em Biologia pelo Centro Universitário UNIVATES (1998). Tem especialização em Planejamento e Gestão Ambiental pelo Centro Universitário UNIVATES (2000). Realizou Mestrado em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (2002) e Doutorado em Ciências: Ecologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (2011). Atualmente é professora do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário UNIVATES, como professora nos cursos de graduação, especialização e no Programa Mestrado em Ensino de Ciências Exatas.

FABÍOLA DRESCH

Graduanda do curso de Biomedicina, Centro Universitário UNIVATES. Funcionária-técnica do Laboratório Didático de Microbiologia do Centro Universitário UNIVATES.

GREICE ALINE KAISECAMP WOLF

Graduanda do curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário UNIVATES. Estagiária do Laboratório Didático de Microbiologia do Centro Universitário UNIVATES.

ROSÂNGELA UHRIG SALVATORI

Possui graduação em Ciências pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos (1981), graduação em Habilitação em Biologia - Licenciatura Plena pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Santa Cruz do Sul (1983) e mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1999). Atualmente é professor do Centro Universitário Univates, socio da Sociedade Brasileira de Microbiologia, comissão - CFAP do Conselho Regional de Biologia 3 Região e coord. lab. de microbiologia didático do Centro Universitário Univates. Durante 15 anos foi Gerente Técnica do Laboratório de Microbiologia do Unianálises - Univates. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia dos Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: salmonela, água, embutidos, coliformes termotolerantes, biossurfactantes e Boas Práticas de Fabricação.

APRESENTAÇÃO

Os assuntos pertinentes à Microbiologia são fundamentais para diferentes áreas, desde a pesquisa básica, aplicada, indústria, etc. No entanto, poucos materiais apresentam noções básicas de trabalho em um laboratório de Microbiologia indispensáveis para os estudantes. Este fato nos motivou a preparar este manual.

As informações aqui apresentadas são o resultado preliminar do trabalho dos profissionais que atuam em laboratórios de Microbiologia, sendo apresentados conhecimentos obtidos na experiência prática adquirida ao longo dos anos ministrando disciplinas dessa área, como Microbiologia Experimental e Microbiologia de Alimentos.

Os experimentos propostos seguem os Padrões Internacionais e são imprescindíveis para a realização de qualquer atividade em um laboratório de Microbiologia. Contempla as Normas Gerais para o bom funcionamento de um Laboratório de Microbiologia, os principais equipamentos necessários para o seu funcionamento, aqui apresentados como Instruções de Trabalho. Também as principais metodologias inerentes a análise de alimentos, transformadas em Procedimentos Operacionais Padrões (POPs). Destina-se principalmente a estudantes como um material auxiliar no seu processo de aprendizagem, bem como pretende subsidiar a prática docente buscando a otimização do tempo do professor que realiza atividades

práticas vinculadas às análises microbiológicas. Foi organizado para ser versátil e de fácil utilização tanto para o estudante quanto para o professor.

Esta é a primeira versão de um manual prático, sendo que estamos cientes de que a microbiologia é uma ciência dinâmica, por isso suas técnicas são rapidamente modificadas, refinadas e atualizadas. Com isto, espera-se apresentar aqui algumas atividades básicas e futuramente realizar a complementação, aprofundamento e atualização.

As autoras

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Centro Universitário UNIVATES pelo apoio financeiro para a execução deste projeto. Ao Laboratório Didático de Microbiologia do Centro Universitário UNIVATES.

As autoras

SUMÁRIO

NORMAS GERAIS – INSTRUÇÃO DE TRABALHO	8	NORMAS GERAIS – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	41
1 - NORMAS DE SEGURANÇA	9	1 - PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA.....	42
2 - LIMPEZA DO LABORATÓRIO	11	2 - CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS EM ÁGUA UTILIZANDO O MEIO ÁGAR NUTRIENTE	44
3 - DESCARTE DE MATERIAL E DE AMOSTRAS.....	12	3 - CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM PRODUTOS COM ATIVIDADE DE ÁGUA MENOR OU IGUAL A 0,95	46
4 - USO E LIMPEZA DO APARELHO DE OSMOSE REVERSA	13	4 - CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM PRODUTOS COM ATIVIDADE DE ÁGUA MAIOR QUE 0,95	48
5 - USO E LIMPEZA DAS BALANÇAS ELETRÔNICAS ..	14	5 - CONTAGEM DE ENTEROBACTERIACEAE	50
6 - USO E LIMPEZA DO BANHO-MARIA	16	6 - CONTAGEM PADRÃO DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS ESTRITOS E FACULTATIVOS VIÁVEIS	52
7 - USO E LIMPEZA DA CAPELA DE FLUXO LAMINAR	18	7 - CONTAGEM TOTAL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES	54
8 - LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS..	19	8 - NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM ÁGUA	56
9 - USO E LIMPEZA DAS ESTUFAS BACTERIOLÓGICAS.....	23	9 - CONTAGEM DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> EM ÁGAR BAIRD-PARKER.....	59
10 - USO E LIMPEZA DAS ESTUFAS DE ESTERILIZAÇÃO E SECAGEM.....	25	10 - DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	62
11 - USO E LIMPEZA DO FORNO DE MICRO-ONDAS ..	27	11 - DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i>	66
12 - USO E LIMPEZA DAS GELADEIRAS	29	12 - CONTAGEM DE <i>BACILLUS CEREUS</i> POR INCUBAÇÃO A 30 °C	69
13 - USO E LIMPEZA DO HOMOGENEIZADOR DE AMOSTRAS (STOMACHER)	30	13 - CONTAGEM DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	71
14 - USO E LIMPEZA DA INCUBADORA PARA BOLORES E LEVEDURAS	31		
15 - USO E LIMPEZA DA AUTOCLAVE	33		
16 - USO E LIMPEZA DO AGITADOR DE TUBOS	36		
17 - USO E LIMPEZA DO CONTADOR DE COLÔNIAS ...	37		
18 - USO E LIMPEZA DO ESTERILIZADOR A VÁCUO ...	38		
19 - PESAGEM DE AMOSTRAS	39		
20 - PREPARO DA SUSPENSÃO INICIAL E DILUIÇÕES DECIMAIS DE AMOSTRAS	40		

1-20

NORMAS GERAIS

Instrução de Trabalho

1- NORMAS DE SEGURANÇA

PRINCIPAIS NORMAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

1. Refrigeradores, Micro-ondas e estufas não são apropriados para aquecer ou conservar alimentos a serem consumidos;
2. Não comer, beber ou fumar dentro do laboratório;
3. O uso do avental de algodão é obrigatório;
4. As mesas ou bancadas de trabalho devem ter superfície lisa, de fácil limpeza e de desinfecção;
5. Quando da manipulação de material tóxico ou infectante, usar luvas de proteção;
6. As pipetas usadas devem ser colocadas horizontalmente em solução desinfetante imediatamente após o uso, antes de se proceder a sua limpeza e esterilização;
7. Não colocar materiais contaminados sobre a bancada. Esses materiais devem ser colocados em recipientes apropriados e esterilizados em autoclave;
8. Cuidado ao acender o bico de gás (bico de Bunsen). Verificar se não existem substâncias inflamáveis por perto;
9. Flambar alças, agulhas e pinças antes e após o uso;
10. Todo o material deve ser identificado. As etiquetas devem ser autoadesivas;
11. No caso de derramamento de algum material infeccioso, cobrir imediatamente a área com um desinfetante adequado e deixar de 15 a 30 minutos antes da limpeza;
12. Devem ser registrados os acidentes como o derrame de cultura, ferimentos etc. Os ferimentos devem ser desinfetados e cobertos com esparadrapo;
13. Os tubos com cultura devem ser conservados sempre em suas respectivas estantes;
14. As culturas de fungos, quando esporuladas, apresentam riscos de infecção respiratória ou de reação alérgica, mesmo sem formar aerossóis. Estas culturas devem ser manipuladas rapidamente e sem movimento brusco;
15. Não cheirar os meios de cultura inoculados;
16. As placas de contagem de bactérias, preparadas com meios inócuos como ágar nutritivo, não podem ser consideradas inofensivas;
17. Lâminas e lamínulas utilizadas devem ser colocadas em recipiente com desinfetante;
18. Lavar e desinfetar as mãos antes de iniciar uma atividade laboratorial. Repetir o mesmo procedimento ao final da análise;

1 - NORMAS DE SEGURANÇA

19. Limpar a mesa de trabalho, antes e depois de cada sessão de trabalho, usando desinfetante;
20. Desinfetar a bancada de trabalho no início e término de cada atividade;
21. Retirar os materiais, amostras e reagentes, bem como equipamentos e aparelhos, da bancada de trabalho tão logo terminar a tarefa;
22. Papéis e resíduos utilizados só devem ser colocados no recipiente de coleta de lixo comum quando não apresentarem risco de contaminação;
23. É indispensável a presença de extintores de incêndio, estrategicamente posicionados no ambiente laboratorial. Os extintores devem ser do tipo pó químico pressurizado (tipo BC), podendo ser utilizados em casos de acidentes elétricos ou em materiais inflamáveis;
24. Desenvolver o hábito da limpeza e da organização;
25. Não permitir a entrada ou permanência de pessoas estranhas no laboratório.

2- LIMPEZA DO LABORATÓRIO

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever os procedimentos de limpeza e desinfecção adotados para o laboratório de microbiologia. Aplicar-se ao Laboratório de Microbiologia.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Gestão da Qualidade.

3 MATERIAIS

Luvas de borracha, álcool 70% e hipoclorito de sódio.

4 PROCEDIMENTO

4.1 BANCADAS

Bancadas, na superfície das quais são realizadas as análises microbiológicas, devem ser limpas com álcool 70% antes de iniciar a análise e ao término da mesma.

4.2. PISO

O piso do laboratório de microbiologia é limpo e desinfetado diariamente com 5 mL de solução de hipoclorito de sódio a 2% , em um litro de água.

4.3 FUNCIONÁRIOS

Os usuários do laboratório usam jaleco e touca durante os procedimentos.

Ao iniciar o trabalho no laboratório é obrigatório a lavagem das mãos e antebraço com detergente apropriado, completando-se a desinfecção com a aplicação de álcool 70%.

4.4 LÂMPADAS

As lâmpadas do laboratório são limpas a seco, semestralmente. Eventualmente lâmpadas são substituídas, quando necessário.

4.5 LIMPEZA DAS VIDRARIAS E

MATERIAIS UTILIZADOS

Os frascos utilizados para amostragem de águas são colocados de molho em solução de hipoclorito de sódio e sabão líquido por no mínimo 24 horas. Lavados com água corrente, detergente e esponja, retirando todos os resíduos do seu interior.

5 REFERÊNCIAS

Métodos de Análises Microbiológicas para alimentos – LARA.

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL

6 REGISTROS

Não aplicável.

3- DESCARTE DE MATERIAL E DE AMOSTRAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de descarte de material utilizado e das amostras processadas no laboratório de microbiologia. Aplica-se ao Laboratório de Microbiologia Didático.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Projeto Destinação dos Resíduos Internos UNIVATES.

3 MATERIAIS

Autoclave, caixa coletora para vidraria danificada, saco para esterilização, saco de lixo comum, caixa coletora para material tóxico e perfuro-cortantes.

4 PROCEDIMENTO

4.1 DESCARTE DE AMOSTRAS

As amostras são descartadas quando do término da análise. As amostras processadas são armazenadas em sacos adequados e destinados à esterilização em autoclave a 121 +/- 1°C por 20 min.

Posteriormente o material é encaminhado ao destino estabelecido para lixo orgânico na Instituição.

As alíquotas de amostras utilizadas para as diluições nos processos analíticos são autoclavadas da mesma forma e também encaminhadas ao lixo orgânico da Instituição.

4.2 DESCARTE DE MATERIAIS NÃO REUTILIZÁVEIS

Placas de Petri e ponteiros são autoclavadas após a realização de análises e descartadas conforme determinado na Instituição, ou seja, destinados ao lixo orgânico.

4.3 DESCARTE DE MATERIAIS TÓXICOS E PERFURO-CORTANTES

Estes materiais são acondicionados em caixa coletora própria, sendo seu recolhimento efetuado quando atingida a capacidade da mesma.

4.4 DESCARTE DE VIDRARIAS DANIFICADAS

Estas vidrarias são armazenadas em caixa coletoras próprias e destinadas a usina de reciclagem da própria Instituição para fins de reaproveitamento.

As vidrarias quebradas com meio de cultura são autoclavadas antes do descarte, acondicionadas em recipientes apropriados (Becker de 1000 mL, potes plásticos).

5 REFERÊNCIAS

Não aplicável.

6 REGISTROS

Não aplicável.

4- USO E LIMPEZA DO APARELHO DE OSMOSE REVERSA

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza do aparelho de Osmose Reversa.

Em laboratórios, a osmose reversa é utilizada para garantir a máxima pureza em seus produtos.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções da Osmose Reversa.

3 MATERIAIS

A osmose reversa é um processo de separação em que um solvente é separado de um soluto de baixa massa molecular por uma membrana permeável ao solvente e impermeável ao soluto.

A membrana permitirá apenas a passagem de solvente (água pura), retendo os solutos (sais dissolvidos e contaminantes). Isso ocorre quando se aplica uma grande pressão sobre este meio aquoso, o que contraria o fluxo natural da osmose.

Pré-filtros, filtro de carvão ativado, coluna de osmose reversa, coluna de resina mista e filtro absoluto.

4 PROCEDIMENTO

4.1 UTILIZAÇÃO DA OSMOSE REVERSA

O equipamento de osmose reversa no laboratório de Microbiologia serve para a obtenção de água a ser

utilizada nos procedimentos analíticos, bem como na última lavagem de vidrarias e materiais pertinentes ao laboratório.

5 REFERÊNCIAS

Manual de utilização do equipamento de osmose reversa – Marconi.

6 REGISTROS

Não aplicável.

5- USO E LIMPEZA DAS BALANÇAS ELETRÔNICAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza das balanças. A balança é um equipamento utilizado para a pesagem de alíquotas de amostras e para o preparo de soluções nutrientes necessárias para os procedimentos analíticos.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções da Balança Eletrônica.

3 MATERIAIS

Detergente neutro, álcool 70%, esponjas e panos de limpeza adequados.

4 PROCEDIMENTO

4.1 DESCRIÇÃO DOS COMPONENTES

Prato da balança; entrada da fonte de alimentação; pés niveladores; tecla liga/desliga; tecla calibração/pesagem; nível da balança; tecla tara; *display*.

4.2 INSTALAÇÃO DAS BALANÇAS

Retirar a balança da embalagem.

Retirar totalmente a trava de segurança para transporte, localizada na parte inferior da balança, girando-a no sentido anti-horário.

Girar a tampa protetora até fechar o orifício. Guardar o dispositivo de travamento para ser usado

em eventuais transportes, ou quando a balança for enviada à assistência técnica.

Importante: O aperto na colocação do dispositivo deve ser efetuado com a mão, sem usar ferramentas auxiliares, tais como alicate, ou outros instrumentos.

Colocá-la sobre a mesa de trabalho em local adequado, isento de radiação de calor, trepidações, correntes de ar e umidade.

Encaixar corretamente o prato na balança.

Encaixar o conector da fonte de alimentação no plugue existente na parte traseira da balança.

NUNCA LIGAR A FONTE À REDE, SEM ANTES TÊ-LA CONECTADA À BALANÇA.

Nivelar a balança pelos pés niveladores até centralizar a bolha de nível.

4.3 UTILIZAÇÃO DAS BALANÇAS

Ao ligar à rede elétrica o *display* mostrará DESLIGADO.

Aguardar 30 minutos de pré-aquecimento.

Se a fonte for desligada ou faltar energia, aguardar novo pré-aquecimento.

NUNCA DESLIGAR A BALANÇA PELO CONECTOR TRASEIRO.

5- USO E LIMPEZA DAS BALANÇAS ELETRÔNICAS

Pressionar L/D. Durante três segundos aparecerão todos os pontos do *display*.

A seguir, o *display* mostrará a versão da balança e logo após: 0.00 g (ou 0,0 g conforme o modelo da balança).

O sinal ~ indica leitura não estabilizada, e o sinal = indica leitura estabilizada.

Se, ao ligar a balança aparecer: Erro: plat. C/P (erro, plataforma com peso), basta remover o peso ou o vasilhame do prato.

Ao desligar a balança pela tecla L/D, o display mostrará: DESLIGADO, contudo a balança continuará energizada para ser mantida em equilíbrio térmico.

Zerar a balança antes de efetuar as pesagens, pressionando T.

Se for necessário o uso de vasilhame, colocá-lo sobre o prato da balança e pressionar T para travá-lo.

Realizar a pesagem pretendida.

Retirar o vasilhame.

Ao iniciar nova pesagem ter o cuidado de verificar se a balança está zerada.

4.4 LIMPEZA

A limpeza é realizada no final da rotina de trabalho.

Antes de iniciar a limpeza, desconectar a balança da rede de corrente elétrica.

Passar um pano umedecido com água e detergente neutro.

Não utilizar detergentes agressivos (solventes ou similares).

Cuidar para que não escorra líquido para o interior da balança. Para evitar que isto aconteça, passar um pano seco e macio, logo após a limpeza com o pano úmido.

Se houver alguma sujeira no prato entre uma pesagem e outra, remover com algodão ou perfex® umedecido em álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS

Manual de utilização da balança eletrônica – Tecnal.

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL.

BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

LACAZ-RUIZ, Rogério. **Manual Prático de Microbiologia Básica**. São Paulo: Editora Edusp, 2000.

6 REGISTROS

Não aplicável.

6- USO E LIMPEZA DO BANHO-MARIA

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza do banho-maria. O banho-maria é um equipamento utilizado para manter uma solução ou qualquer outro material a uma temperatura constante. É utilizado também, para preparação de meios de cultura e para incubação de micro-organismos. Em casos de incubações exigentes à temperatura, utilizar o banho-maria com circulação de água.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções do banho-maria.

3 MATERIAIS

Termômetro, água destilada, sabão neutro, álcool 70%, esponja e panos adequados.

4 PROCEDIMENTO

4.1 DESCRIÇÃO DOS COMPONENTES

Termostato automático: de 20 °C a 120 °C.

Lâmpada piloto: quando acesa indica que o banho-maria está ligado; ao atingir a temperatura desejada, a luz se apagará.

Chave liga-desliga: com chave reversível, que seleciona a voltagem 110 ou 220 volts.

4.2 CARACTERÍSTICAS

O banho-maria é um equipamento constituído em chapa de aço inox, com paredes duplas e isoladas com lã de vidro.

A tampa e as estantes são de aço inoxidável. Deve-se optar pelos banhos-maria que apresentam tampa em cunha, que evitam gotejamento da água evaporada, fazendo com que esta corra para as extremidades da mesma.

4.3 UTILIZAÇÃO DO BANHO-MARIA

Abrir a tampa e colocar água até que a solução a ser preparada fique submersa.

No caso de incubação de tubos inoculados, estes devem permanecer mergulhados na água, até uma altura superior à superfície do meio de cultura.

Introduzir o material a ser incubado.

Regular o termostato para a temperatura adequada.

Ligar a chave elétrica.

Atingida a temperatura requerida, a lâmpada-piloto se apaga.

Utilizar termômetro para a verificação da temperatura.

O tempo de incubação e a temperatura variam de acordo com o meio e o indicado pelo fabricante.

6- USO E LIMPEZA DO BANHO-MARIA

No caso de manutenção de meios com ágar, no estado líquido, recomenda-se a temperatura máxima de 45 °C, para não comprometer nutrientes presentes no meio.

A temperatura para a cultura de micro-organismos obedece a metodologia utilizada.

4.4 CONTROLE DE TEMPERATURA

Para controlar a temperatura máxima atingida utilizar termômetro de máxima com trava.

Registrar apropriadamente os dados pertinentes ao controle de temperatura.

4.5 LIMPEZA

A limpeza é feita semanalmente com água e detergente neutro.

Após a limpeza, é feita a desinfecção com álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS

Manual de utilização do banho-maria.

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL.

BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

LACAZ-RUIZ, Rogério. Manual Prático de Microbiologia Básica. São Paulo: Editora Edusp, 2000.

6 REGISTROS

Não aplicável.

7- USO E LIMPEZA DA CAPELA DE FLUXO LAMINAR

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza da capela de fluxo laminar.

O equipamento é destinado ao procedimento de inoculação das amostras.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções da Capela de Fluxo Laminar.

3 MATERIAIS

Lâmpada UV, detergente neutro, ácido peracético 0,2 % ou álcool 70%.

4 PROCEDIMENTOS

4.1 UTILIZAÇÃO DA CAPELA DE FLUXO LAMINAR

Antes de iniciar os trabalhos, fazer a desinfecção com álcool 70%, de toda a parte interna do fluxo;

Ligar o aparelho;

Ligar a lâmpada germicida e esperar 15 minutos, no mínimo, para desligá-la;

Colocar todo o material necessário para o procedimento evitando o afastamento do fluxo laminar;

Manipular rapidamente as amostras, mas com segurança para evitar erros e desperdícios. O descarte de pipetas e outros materiais deve ser feito em utensílio próprio que permanece próximo à cabine do fluxo laminar.

4.2 LIMPEZA

A limpeza é feita diariamente: antes do início dos procedimentos analíticos e ao final destes;

Passar um pano umedecido com álcool 70%; caso houver necessidade, limpar com detergente neutro;

Remover todo o vestígio de espuma e, novamente proceder a desinfecção;

Quando usar álcool para a desinfecção, cuidar para não passar nas áreas em acrílico, pois ficarão irreversivelmente foscas.

5 REFERÊNCIAS

Manual de Métodos de Análises Microbiológicas em Alimentos – ITAL

BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

LACAZ-RUIZ, Rogério. Manual Prático de Microbiologia Básica. São Paulo: Editora Edusp, 2000, 129 p.

6 REGISTROS

Não aplicável.

8- LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever a relação de materiais utilizados nos procedimentos analíticos do Laboratório de Microbiologia bem como o seu preparo e esterilização. Laboratório de Microbiologia.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT-1295

3 MATERIAIS

Álcool 70%, algodão hidrófilo, algodão hidrófobo, autoclave, balança analítica, bastões de vidro, destilador, deionizador para água, ou aparelho de osmose reversa, escovetes de diversos tamanhos, esponjas de aço e de fibra sintética, espátulas de aço inoxidável, estufa de esterilização e secagem, equipada com termômetro, papel alumínio ou papel Kraft, luvas de amianto, luvas de borracha, provetas graduadas de 1000 mL, 500 mL, 250 mL e 100 mL de borossilicato ou vidro neutro, tesoura, pinça de aço inoxidável, indicadores de esterilização (fita ou ampola com suspensão de *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*), bico de Bunsen, tripé, tela de amianto, béqueres de borossilicato ou vidro neutro, estiletes, fita adesiva tipo crepe ou barbante, gaze.

4 PROCEDIMENTOS

Antes de iniciar o procedimento de lavagem, retirar a identificação das vidrarias com algodão umedecido em álcool ou acetona.

4.1 PREPARO DE PROVETAS, FRASCOS DE ERLNMEYER, FRASCOS SHOTT E BÉQUERES

4.1.1 LAVAGEM

Lavar com água e detergente, utilizando esponja e escovete. Caso os materiais apresentem incrustações ou resíduos gordurosos, proceder à imersão destes em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente neutro.

Enxaguar dez vezes com água corrente, enchendo e esvaziando totalmente a vidraria.

Utilizar no último enxágue, água destilada ou deionizada.

Deixar drenar a água das vidrarias e secar em estufa a 100 °C.

4.1.2 PREPARO E ESTERILIZAÇÃO

Colocar tampão de algodão hidrófobo e gaze no bocal dos frascos erlenmeyer. Cobrir com folha de alumínio ou papel Kraft e fixar com barbante, atilho ou fita adesiva tipo crepe.

8- LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Cobrir os bocais das provetas e dos béqueres com folha de alumínio ou papel Kraft e fixar com fita adesiva tipo crepe, atilho ou barbante.

Esterilizar em autoclave a 121 °C, por 30 min ou em estufa a 170 °C – 180 °C por 2 horas.

Identificar o material com data de esterilização e prova de esterilização.

Observação: *Frascos destinados ao preparo de meios de cultura, que são submetidos à esterilização por autoclave no momento do preparo do meio, dispensam esterilização prévia.*

4.2 PLACAS DE PETRI DESCARTÁVEIS USADAS

Colocar em saco próprio para autoclave, esterilizar a 121 +/- 1 °C por 30 minutos e descartar.

4.3 PREPARO DE PIPETAS

4.3.1 LAVAGEM

Retirar o algodão do bocal de cada pipeta com estilete de ponta fina ou agulha histológica.

Imergir as pipetas em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente por 24 horas.

Enxaguar em água corrente.

Se necessário, imergir em solução de hexano alcalino até total eliminação dos resíduos.

Enxaguar, tantas vezes quantas forem necessárias, até a eliminação completa dos resíduos.

Enxaguar com água destilada ou deionizada.

Secar em estufa a 100 °C.

4.3.2 ESTERILIZAÇÃO

Colocar algodão hidrófobo no bocal das pipetas.

Acondicionar em porta-pipetas ou embrulhar em grupos em papel Kraft.

Identificar o material com nome, volume, data de esterilização e prova de esterilização.

Esterilizar em estufa a 170 °C, por 2 horas ou em autoclave a 121 °C por 30 minutos.

Identificar o material com data de esterilização e prova de esterilização.

4.4 PREPARO DE TUBOS DE DURHAM

4.4.1 LAVAGEM

Colocar em um recipiente com água e levar ao micro-ondas até ferver.

Imergir em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente neutro por no mínimo 24 horas.

Lavar os tubos com água e detergente.

8- LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Colocar, se necessário, os tubos em recipiente com solução hexano alcalino até total eliminação dos resíduos.

Enxaguar dez vezes em água corrente, enchendo e esvaziando totalmente os tubos.

Colocar em um recipiente com água destilada ou deionizada e levar ao micro-ondas até ferver.

Deixar esfriar e retirar bem a água.

Secar em estufa a 100 °C.

Os tubos de Durham dispensam prévia esterilização.

4.5 PREPARO DE TUBOS DE ENSAIO COM TAMPAS

4.5.1 LAVAGEM

Esvaziar o conteúdo do tubo e colocar de molho em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente neutro por no mínimo 24 horas.

Lavar com água e detergente, utilizando escovetes e esponjas para retirar resíduos internos.

Enxaguar em água corrente.

Colocar, se necessário, os tubos em recipiente contendo solução hexano alcalino até total eliminação dos resíduos.

Enxaguar dez vezes em água corrente, enchendo e esvaziando totalmente os tubos.

Utilizar no último enxágue, água destilada ou deionizada.

Deixar escorrer bem toda a água, colocar os tubos para secar em estufa a 100 °C.

4.5.2 TAMPAS

Imergir em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente neutro por no mínimo 24 horas.

Lavar com água e detergente.

Enxaguar dez vezes em água corrente.

Utilizar no último enxágue, água destilada ou deionizada.

Deixar escorrer a água e secar em estufa a 50 °C.

4.5.3 ESTERILIZAÇÃO

Esse procedimento é necessário para tubos utilizados para conter meios de cultura já estéreis ou para soluções em ensaios complementares específicos.

Vedar os tubos secos com as tampas, embrulhar em papel Kraft em grupos de três ou cinco, de acordo com a utilização e esterilizar em autoclave a 121 °C, por 30 min, ou em estufa a 180 °C, por 2 horas.

Identificar com nome, volume, data de esterilização e prova de esterilização.

8- LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.6 PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE PINÇAS

4.6.1 LAVAGEM

Lavar as pinças com água e detergente.

4.6.2 ESTERILIZAÇÃO

Embrulhar em grupos as pinças em papel Kraft ou papel alumínio.

Esterilizar em autoclave a 121 °C, por 30 min, ou em estufa a 180 °C, por 2 horas.

Identificar com nome, data de esterilização e prova de esterilização.

4.7 PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE BASTÕES

TIPO HÓQUEI

4.7.1 LAVAGEM

Lavar o material com água e detergente.

4.7.2 ESTERILIZAÇÃO

Embrulhar individualmente os bastões em papel Kraft ou papel alumínio.

Esterilizar em autoclave a 121 °C, por 30 min, ou em estufa a 180 °C, por 2 horas.

Identificar o material com data de esterilização e prova de esterilização.

4.8 PONTEIRAS DESCARTÁVEIS USADAS

Esterilizar em autoclave a 121+/-1 °C, por 30 minutos e descartar.

5 REFERÊNCIAS

Métodos de Análises Microbiológicas para alimentos – LARA.

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL.

6 REGISTROS

Não aplicável.

9- USO E LIMPEZA DAS ESTUFAS BACTERIOLÓGICAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza de estufas bacteriológicas.

A estufa de incubação ou bacteriológica é um equipamento utilizado para os procedimentos analíticos, ou seja, para a cultura de microrganismos que possa estar presente nas amostras processadas, em uma temperatura pré-determinada.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções da Estufa Bacteriológica.

3 MATERIAIS

Termômetro de máxima e mínima, detergente neutro, álcool 70%, esponjas e panos de limpeza adequados.

4 PROCEDIMENTO

4.1 DESCRIÇÃO DOS COMPONENTES

Respiro: serve para expelir o excesso de calor e manter a uniformidade da temperatura. Antes de ligar é necessário remover a tampa plástica.

Lâmpada piloto: quando acesa indica que a estufa está ligada, ao atingir a temperatura desejada a luz se apagará.

Chave liga-desliga: além de permitir ligar ou desligar o aparelho, é através dela que se altera a tensão da eletricidade.

Controlador eletrônico: regulável da temperatura ambiente até 240 °C. Controle programável manualmente.

Termômetro de máxima e mínima: serve para acompanhamento das oscilações de temperatura.

4.2 UTILIZAÇÃO ESTUFAS DE INCUBAÇÃO

Regular o termostato para a temperatura programada.

Ligar a estufa na rede, o interruptor é acionado e a lâmpada piloto acende.

Ao atingir a temperatura programada, a lâmpada piloto apaga.

Colocar o termômetro no orifício localizado acima da estufa ou no seu interior.

A TEMPERATURA DEPENDE DO MATERIAL INCUBADO. O LIMITE DE TOLERÂNCIA FICA EM ± 1 °C.

4.3 ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL ANALÍTICO

Placas que se destinam à cultura de bactérias são incubadas invertidas.

9- USO E LIMPEZA DAS ESTUFAS BACTERIOLÓGICAS

Não sobrepor mais que cinco placas para garantir uma uniformidade de distribuição de temperatura.

Os tubos devem ser levados em estantes apropriadas e com garantia de que o calor possa permear entre eles.

É rigorosamente necessário que todo o material que vai para a estufa esteja identificado.

Saquetas e erlenmeyers utilizados em pré-enriquecimentos de algumas análises devem estar identificados e separados de tal forma que o ar quente consiga circular entre eles.

4.4 LIMPEZA

A limpeza é feita semanalmente.

Passar um pano umedecido com álcool 70%.

Se houver alguma sujeira, como pingos de amostras incubadas, passar esponja com detergente neutro.

Retirar toda a espuma com um pano enxaguado várias vezes em água limpa.

Após a limpeza passar um pano umedecido com álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL.

BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

LACAZ-RUIZ, Rogério. **Manual Prático de Microbiologia Básica**. São Paulo: Editora Edusp, 2000.

6 REGISTROS

Não aplicável.

10- USO E LIMPEZA DAS ESTUFAS DE ESTERILIZAÇÃO E SECAGEM

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza das estufas de esterilização e secagem de materiais. A estufa de esterilização e secagem destina-se à esterilização de vidrarias necessárias para procedimentos analíticos, bem como para a secagem de material.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções da Estufa de Esterilização e Secagem.

3 MATERIAIS

Termômetro de máxima com trava, papel de embrulho, *Bacillus subtilis*, fita adesiva, detergente neutro, álcool 70%, esponja e panos de limpeza adequados.

4 PROCEDIMENTO

4.1 DESCRIÇÃO DOS COMPONENTES

Respiro: serve para expelir o excesso de calor e manter a uniformidade da temperatura. Antes de ligar é necessário remover a tampa plástica.

Lâmpada piloto: quando acesa indica que a estufa está ligada, ao atingir a temperatura desejada a luz se apagará.

Chave liga-desliga: além de permitir ligar ou desligar o aparelho, é através dela que se altera a voltagem.

Controlador eletrônico: regulável da temperatura ambiente até 240 °C. Controle programável manualmente.

Termômetro de Escala Linear: Serve para fazer a medida da temperatura dentro da estufa. É colocado através do respiro.

4.2 UTILIZAÇÃO DA ESTUFA DE ESTERILIZAÇÃO E SECAGEM

Antes de ligar, verificar se a estufa e a rede elétrica são da mesma tensão elétrica.

Para trocar a tensão, soltar o parafuso que prende a capa da chave, girar com a alavanca no ponto central.

Verificar a marcação existente no painel e fazer a ligação de acordo com a rede elétrica no local, reapertar o parafuso que prende a capa da chave.

Regular o termostato para a temperatura programada.

Ligar a estufa na rede, o interruptor é acionado e a lâmpada piloto acende.

Ao atingir a temperatura programada, a lâmpada piloto apaga.

Colocar o termômetro de máxima no orifício localizado acima da estufa.

10- USO E LIMPEZA DAS ESTUFAS DE ESTERILIZAÇÃO E SECAGEM

4.3 PREPARAÇÃO DO MATERIAL A SER ESTERILIZADO

Proteger as placas de Petri e pipetas graduadas com papel de embrulho.

A temperatura de esterilização é no mínimo 170 °C.

O tempo necessário para esterilização é no mínimo 2 horas.

O papel que protege o material adquire cor parda, não devendo escurecer em demasia e nem se tornar quebradiço.

4.4 CONTROLE DE TEMPERATURA

Para controlar a temperatura máxima atingida durante a esterilização, utilizar termômetro de máxima com trava.

Opcionalmente pode ser utilizado *Bacillus subtilis* para a verificação da eficiência do processo de esterilização.

Verificar a temperatura atingida pelo termômetro. Não atingida a temperatura de esterilização, retornar o material para a estufa e esterilizar novamente.

Abrir o forno Pasteur somente depois que este estiver atingido equilíbrio com a temperatura ambiente, pois o contato do ar frio com o vidro superaquecido irá provocar quebra e estilhaços, podendo atingir o operador.

4.5 LIMPEZA

A limpeza é feita semanalmente com água e detergente neutro.

Após a limpeza, é feita a desinfecção com álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS

Métodos de Análises Microbiológicas para alimentos – LARA.

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL

6 REGISTROS

Não aplicável.

11- USO E LIMPEZA DO FORNO DE MICRO-ONDAS

1 OBJETIVOS E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever os procedimentos para uso e limpeza do forno micro-ondas. O Forno Micro-ondas é utilizado para preparação de meios de cultura e fervura de tubos de Durham.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções de uso do forno micro-ondas.

3 MATERIAIS

Detergente neutro, álcool 70%.

4 PROCEDIMENTO

4.1 INSTRUÇÕES DE USO

Verifique se está corretamente ligado e sem nenhum material entre a porta e o gabinete;

Verifique se o prato giratório e seu suporte estão bem encaixados toda a vez que ligar o forno;

Nunca ligue o forno vazio, pois isso pode provocar faíscas em seu interior;

Mantenha a tampa do guia de ondas sempre limpa: resíduos nesse local impedem a passagem das micro-ondas, podendo provocar choque elétrico;

Se o material ou recipiente que estão dentro do forno faiscarem durante a operação, mantenha a porta

aparelho fechada, desligue-o e desconecte o cabo de força da tomada;

Use sempre luvas térmicas para retirar o material do forno, pois há transferência de calor aos recipientes;

Depois de retirar o material do forno, manuseie com cuidado, evitando que o vapor formado pelo aquecimento entre em contato com mãos ou rosto do manipulador.

4.2 CUIDADOS DURANTE A LIMPEZA

Mantenha sempre a porta aberta ao limpar qualquer das partes de micro-ondas: isso evita que ele seja ligado acidentalmente com o interior vazio;

Antes de limpar a parte interna, remova o prato giratório e o suporte;

Nunca jogue água em parte alguma do gabinete ou da porta: limpe-os interna e externamente com pano umedecido com uma mistura de água e detergente neutro;

Nunca utilize detergentes fortes (abrasivos), álcool, amoníaco ou produtos químicos não indicados, nem use pós, palha de aço ou esponjas grossas para lavar os acessórios;

Para fazer a limpeza completa do forno (parte interna e externa), desconecte o plugue da tomada;

11- USO E LIMPEZA DO FORNO DE MICRO-ONDAS

Caso a porta embaçar e o interior do forno reter água após o preparo de algum material, seque todas as partes umedecidas com um pano macio (perfex®).

A limpeza geral obedece ao cronograma semanal.

5 REFERÊNCIAS

BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

LACAZ-RUIZ, Rogério. **Manual Prático de Microbiologia Básica**. São Paulo: Editora Edusp, 2000.

6 REGISTROS

Não aplicável.

12- USO E LIMPEZA DAS GELADEIRAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever os procedimentos para limpeza e uso das geladeiras de acordo com a finalidade a que se destinam. As geladeiras são utilizadas para manutenção de amostras refrigeradas aguardando processamento e de meios de cultura.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções – Geladeira / Freezer Consul.

3 MATERIAIS

Termômetro, detergente neutro e álcool 70%.

4 PROCEDIMENTO

4.1 FINALIDADES

As geladeiras do Laboratório de Microbiologia apresentam duas finalidades:

As geladeiras 1 e 2 são utilizadas para estocagem de material de laboratório tais como meios de cultura, reagentes e outros materiais pertinentes às análises.

A geladeira 3, é utilizada para armazenamento de material contaminado e cepas.

4.2 PROCEDIMENTO DE UTILIZAÇÃO DE GELADEIRA

Regular o termostato para a temperatura programada;

Ligar a geladeira na rede.

4.3 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA DAS GELADEIRAS

A limpeza é feita mensalmente com água e detergente neutro.

Após a limpeza, é feita a desinfecção com álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS

Método de Análises Microbiológica para Alimentos – LARA.

6 REGISTROS APLICÁVEIS

Não aplicável.

13- USO E LIMPEZA DO HOMOGENEIZADOR DE AMOSTRAS (STOMACHER)

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza do homogeneizador de amostras. O homogeneizador é um equipamento utilizado para a trituração e homogeneização de amostras.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções do Bag Mixer® 400.

3 MATERIAIS

Detergente neutro, álcool 70%, esponjas e panos de limpeza adequados.

4 PROCEDIMENTO

4.1 DESCRIÇÃO DOS COMPONENTES

Botão do *timer*

Alavanca para a abertura e fechamento da porta

Conjunto de pás homogeneizadoras.

4.2 INSTALAÇÃO DO HOMOGENEIZADOR

Remover o equipamento da embalagem.

Colocar em uma superfície plana e estável.

4.3 UTILIZAÇÃO DO HOMOGENEIZADOR

Ligar o aparelho na corrente elétrica.

Ajustar o tempo necessário para a homogeneização de acordo com a amostra.

Abrir a porta e inserir o saco estéril com a amostra e o diluente.

Fechar a porta prendendo a extremidade do saco.

O homogeneizador iniciará o ciclo automaticamente, parando no final do tempo estabelecido.

Abrir a porta e retirar a saqueta.

O homogeneizador estará pronto para um novo ciclo.

4.4 LIMPEZA DO HOMOGENEIZADOR

Desligar da corrente elétrica.

A limpeza é feita semanalmente ou mais frequentemente, se necessário, com água e detergente neutro.

Utilizar pano adequado passando nas pás de homogeneização e no interior do equipamento.

Cuidar para que resíduos de detergente não permaneçam no equipamento.

Após a limpeza, é feita a desinfecção com álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS

Não aplicável.

6 REGISTROS

Não aplicável.

14- USO E LIMPEZA DA INCUBADORA PARA BOLORES E LEVEDURAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza da incubadora para fungos.

A incubadora para fungos é um equipamento utilizado para a cultura de amostras submetidas a pesquisa de bolores e leveduras.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções Incubadora de Fungos Marconi.

3 MATERIAIS

Termostato, detergente neutro e álcool 70%.

4 PROCEDIMENTO

A INCUBADORA DE FUNGOS É UTILIZADA EXCLUSIVAMENTE PARA O CULTIVO DE BOLORES E LEVEDURAS.

4.1 PROCEDIMENTO DE UTILIZAÇÃO DA INCUBADORA PARA FUNGOS

Acionar o interruptor geral e deixar os componentes eletrônicos estabilizarem por 5 minutos, lembrando sempre que o mesmo não pode ser ligado e desligado em intervalos inferiores a 3 minutos.

Selecionar a temperatura desejada.

A lâmpada piloto ao apagar, indica que a temperatura de termostatização foi atingida e, após isto, iniciam-se os ciclos de liga-desliga, para manutenção da temperatura desejada.

Aguardar a estabilização da temperatura +/- 30 minutos.

Em caso de necessidade de movimentação do aparelho, esperar 30 minutos antes de religá-lo.

Não abrir a porta frequentemente para evitar a condensação dentro da câmara interna.

Para evitar problemas com a estabilização da temperatura, manter o interruptor ligado constantemente.

A TEMPERATURA DEPENDE DA METODOLOGIA EMPREGADA. O LIMITE DE TOLERÂNCIA FICA EM ± 1 °C.

4.2 LIMPEZA

A limpeza é realizada semanalmente.

Limpar com uma esponja, água e detergente neutro.

Retirar todo o resíduo de espuma com um pano enxaguado em água limpa.

Para a desinfecção, passar um pano umedecido em álcool 70%.

14- USO E LIMPEZA DA INCUBADORA PARA BOLORES E LEVEDURAS

5 REFERÊNCIAS

Método de Análises Microbiológica para Alimentos – LARA

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL.

BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

LACAZ-RUIZ, Rogério. Manual Prático de Microbiologia Básica. São Paulo: Editora Edusp, 2000, 129p.

6 REGISTROS

Não aplicável.

15- USO E LIMPEZA DA AUTOCLAVE

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza da autoclave. A autoclave é um aparelho utilizado nos processos de esterilização a vapor e pressão, sendo empregada para materiais destinados a análises, meios de cultura e materiais contaminados para descarte.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Manual de Instruções da autoclave Phoenix®.

3 MATERIAIS

Detergente neutro, esponja, jarra, água potável, água deionizada ou destilada.

4 PROCEDIMENTO

4.1 UTILIZAÇÃO DA AUTOCLAVE

Abrir a tampa e colocar água na caldeira até cobrir o descanso do cesto.

Introduzir o material a ser esterilizado.

Fechar a tampa, apertando bem e por igual, os manípulos.

Abrir o registro de pressão e ligar a chave elétrica no calor máximo.

Aguardar o começo da saída do jato contínuo de vapor d'água e, então, fechar o orifício de escapamento.

Atingida a pressão de trabalho, regular a chave elétrica para o médio, a fim de manter a pressão.

Verificar a válvula de segurança de modo que o manômetro fique estável.

Regular o relógio minuteiro para controlar o tempo de esterilização.

Terminado o tempo de esterilização, desligar a autoclave.

Esperar o manômetro descer a zero e abrir o registro para a saída do vapor.

O TEMPO PARA A REDUÇÃO DA PRESSÃO É IMPRESCINDÍVEL PARA A EFICIÊNCIA DA ESTERILIZAÇÃO.

Jamais se deve forçar um abaixamento da pressão para abrir a autoclave, pois todo o procedimento será comprometido.

Abrir a tampa e retirar o material sempre utilizando luvas de amianto.

Em cada esterilização verificar o nível de água.

Para troca de água e limpeza da autoclave utilizar o registro inferior.

Materiais limpos e materiais contaminados são autoclavados em ciclos separados.

15- USO E LIMPEZA DA AUTOCLAVE

O material limpo é esterilizado em autoclave à temperatura de 121 °C, com tolerância de 1 °C, por 15 minutos.

A esterilização em excesso de meios de cultura pode alterar características bioquímicas, propriedades nutritivas e deteriorar a qualidade do meio;

Esterilização insuficiente pode não destruir as bactérias presentes;

A eficiência da esterilização pode ser observada através do controle da temperatura ou da eficiência biológica.

Para melhor eficiência da autoclave é recomendável:

- Não empacotar objetos totalmente fechados.
- Garantir o perfeito vedamento da tampa antes de ligar o vapor.
- Retirar todo o excesso de ar, trocando-o por vapor.
- Aguardar o equilíbrio de pressão antes de reabrir a autoclave. Observar continuamente as marcações do manômetro e do termômetro.
- Para abrir a tampa da câmara de autoclave, deve-se observar se todo o vapor foi evacuado e se o manômetro está marcando zero.
- Para retirada de material recém autoclavado, deve-se utilizar luvas de amianto de cano longo.
- A água utilizada na autoclave deve ser destilada ou deionizada.

4.2 CONTROLE DA TEMPERATURA

Opção 1:

- a) Utilizar, a cada ciclo, fitas para autoclave que são esterilizadas junto com o material.
- b) Findo o período de esterilização, verificar a cor desenvolvida na fita.
- c) O desenvolvimento de listras mais escuras na fita indica a temperatura de esterilização atingida.
- d) Utilizar juntamente com as fitas para autoclave, termômetro de máxima com trava e, no fim da esterilização, verificar a temperatura máxima.
- e) Não atingida a temperatura de esterilização, recomencar todo o processo.
- f) Caso a temperatura de esterilização ultrapassar a temperatura recomendada, descartar o material autoclavado.
- g) Os dados obtidos são anotados em relatório de controle.

Opção 2:

- a) Pode-se avaliar a eficiência das esterilizações através do controle de eficiência biológica:
- b) Utilizar esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Devido à termorresistência dos esporos, estes somente são destruídos a uma temperatura de 120+/-1 °C, por 15 minutos, com 1 atm de pressão.

15- USO E LIMPEZA DA AUTOCLAVE

Em temperaturas mais baixas ou períodos mais curtos não há destruição dos esporos.

- c) As ampolas são colocadas junto com o material a esterilizar, acondicionadas em tubo de ensaio para evitar que, no caso de rompimento de uma ampola haja contaminação.
- d) Após o tratamento em autoclave é controlado o resultado através da incubação das ampolas em estufa, a 55 °C, por 24/48 horas.
- e) Incubar junto uma ampola que não tenha sido esterilizada como prova de controle.
- f) Sendo a esterilização eficiente não há crescimento de *Bacillus stearothermophilus* e a coloração violeta da ampola permanece inalterada.
- g) Em caso de esterilização ineficiente, o crescimento dos bacilos é observado pela turvação do caldo e acidificação por fermentação dos açúcares e sua cor muda de violeta para amarelo.
- h) A ampola controle também muda de coloração passando de violeta para amarelo.

4.3 LIMPEZA

Autoclaves de esterilização de meios de cultura e vidraria

A limpeza é feita semanalmente com água e detergente neutro.

Autoclaves de esterilização de material contaminado

A limpeza é feita após cada ciclo com água e detergente neutro.

5 REFERÊNCIAS

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de alimentos – ITAL.

BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

LACAZ-RUIZ, Rogério. **Manual Prático de Microbiologia Básica**. São Paulo: Editora Edusp, 2000.

6 REGISTROS

Não aplicável.

16- USO E LIMPEZA DO AGITADOR DE TUBOS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza do agitador de tubos de ensaio.

O agitador de tubos de ensaio é um aparelho importante no processo de análises microbiológicas, já que homogeneiza o conteúdo dos tubos de ensaio através de agitação circular.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Não aplicável.

3 MATERIAIS

Álcool 70% e algodão.

4 PROCEDIMENTO

4.1 UTILIZAÇÃO DO AGITADOR DE TUBOS

O aparelho deve ser ligado na corrente elétrica.

A chave liga/desliga deve ser posicionada na opção LIGA.

Deve-se selecionar a agitação desejada (contínua ou não).

Para agitar o tubo, basta, segurando firme, posicioná-lo sobre o suporte, na parte superior do aparelho e pressionar para que seu funcionamento inicie.

Agitar o conteúdo durante alguns segundos, e prosseguir a análise.

4.2 LIMPEZA

Antes e depois do uso, o agitador deve ser limpo com algodão embebido em álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Não aplicável.

6 REGISTROS

Não aplicável.

17- USO E LIMPEZA DO CONTADOR DE COLÔNIAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de uso e limpeza do contador de colônias. O contador de colônias é um utensílio que auxilia na contagem das colônias de microorganismos cultivadas nas placas de petri, através de sua observação na lupa, e com iluminação.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Não aplicável.

3 MATERIAIS

Placa de petri com cultura e caneta para retroprojektor.
Álcool 70% e algodão.

4 PROCEDIMENTO

4.1 UTILIZAÇÃO DO CONTADOR DE COLÔNIAS

Ligar o aparelho na corrente elétrica.

Ligá-lo no botão liga/desliga – este procedimento acenderá a lâmpada.

Colocar a placa com a cultura sobre a base quadriculada.

Contar as colônias existentes.

Caso, o número de colônias seja muito elevado, pode-se contar um quadrante e multiplicar por 20. Esta

será uma contagem estimada do número de colônias da placa.

4.3 LIMPEZA

Depois do uso, o equipamento deve ser limpo com algodão embebido em álcool 70%.

5 REFERÊNCIAS

Não aplicável.

6 REGISTROS

Não aplicável.

18- USO E LIMPEZA DO ESTERILIZADOR A VÁCUO

1 OBJETIVO

Descrever o procedimento de uso e limpeza do contador de colônias.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

O contador de colônias é um utensílio que auxilia na contagem das colônias de micro-organismos cultivadas nas placas de petri, através de sua observação na lupa, e com iluminação.

3 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Não aplicável.

4 MATERIAIS

Placa de petri com cultura e caneta para retroprojektor.

Álcool 70% e algodão.

5 PROCEDIMENTO

5.1 UTILIZAÇÃO DO CONTADOR DE COLÔNIAS

Ligar o aparelho na corrente elétrica.

Ligá-lo no botão liga/desliga – este procedimento acenderá a lâmpada.

Colocar a placa com a cultura sobre a base quadriculada.

Contar as colônias existentes.

Caso, o número de colônias seja muito elevado, pode-se contar um quadrante e multiplicar por 20. Esta será uma contagem estimada do número de colônias da placa.

5.2 LIMPEZA

Depois do uso, o agitador deve ser limpo com algodão embebido em álcool 70%.

6 REFERÊNCIAS

Não aplicável.

7 REGISTROS

Não aplicável.

19- PESAGEM DE AMOSTRAS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Descrever o procedimento de pesagem de amostras para análise microbiológica.

A pesagem correta das amostras é de suma importância para a inocuidade da amostra e sua proporcionalidade em relação ao diluente.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

ISO 6887-1 : 2011.

3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Álcool 70%;

Algodão;

Colher estéril, pinça estéril, cabo e lâmina de bisturi estéreis (de acordo com a amostra a ser pesada);

Bolsa plástica estéril;

Balança de precisão;

Bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar.

4 PROCEDIMENTO

4.1 Desinfetar com algodão e álcool 70% e ligar a balança conforme IT MIC004;

4.2 Ligar a chama, ou utilizar a capela de fluxo laminar, seguindo a IT MIC006;

4.3 Próximo à chama, ou com a exaustão da capela ligada, pesar, em uma bolsa estéril uma quantidade de amostra representativa de, no mínimo 10 g ou 10 mL, variando em, no máximo 5% do valor pesado, para menos ou para mais;

4.4 Fechar assepticamente a bolsa e repetir com as demais amostras;

4.5 Desligar a balança.

5 REFERÊNCIAS

Não aplicável.

6 REGISTROS

Não aplicável.

20- PREPARO DA SUSPENSÃO INICIAL E DILUIÇÕES DECIMAIS DE AMOSTRAS

1 OBJETIVO

Descrever o procedimento de preparo da suspensão inicial e das diluições decimais das amostras para análises microbiológicas.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

A diluição das amostras garante a inoculação adequada dos microrganismos no meio de cultura.

3 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

ISO 6887-1: 2011.

4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Álcool 70%;

Algodão;

Tubos de ensaio ou frascos com diluente apropriado, na quantidade necessária para a amostra (9 partes de diluente para uma parte de amostra);

ponteiras de 1 mL;

Micropipetador de 1 mL;

Agitador de tubos;

Homogeneizador de amostras (*Stomacher*);

Bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar.

5 PROCEDIMENTO

5.1 Efetuar a pesagem da amostra, conforme IT MIC018;

5.2 Com a chama ligada, adicionar à bolsa com a amostra, o diluente na proporção indicada no item 4;

5.3 Homogeneizar no *stomacher*, observando a IT MIC012;

5.4 Se a amostra possuir grandes partículas, deixar descansar para que as mesmas sedimentem. **Esta será a suspensão inicial.**

5.5 Com auxílio de ponteira e micropipetador estéreis, subtrair 1 mL desta suspensão e repassar para um tubo de ensaio contendo o diluente apropriado;

5.6 Homogeneizar com o agitador de tubos (ver IT MIC015). **Esta será a primeira diluição decimal, e a partir dela, serão feitas as sucessivas diluições, de acordo com a necessidade de cada amostra.**

6 REFERÊNCIAS

Não aplicável.

7 REGISTROS

Não aplicável.

1-13

NORMAS GERAIS

Procedimento Operacional Padrão

1-PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Meios de cultura desidratados fornecidos por diferentes fabricantes podem apresentar pequenas diferenças em suas composições.

Observar atentamente a quantidade necessária de meio desidratado, em gramas por litro de meio a ser preparado, o modo de preparo, o tempo e a temperatura de esterilização em cada caso.

Ao adquirir meios de cultura, observar atentamente a formulação, comparando-a com aquela indicada neste manual. Às vezes, as diferentes marcas utilizam diferentes termos para uma mesma substância. Por exemplo, os termos triptona e tripticase referem-se à peptona de caseína obtida por digestão triptica ou pancreática. Assim, os produtos Ágar tripticase soja, Ágar soja triptona, Caso Ágar (antigo Casoy) referem-se à um produto que contém peptona de caseína (obtida por digestão triptica ou pancreática) e peptona de farinha de soja.

PREPARAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

- Os meios comerciais devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.

- Os meios preparados não comerciais devem ser pesados separadamente em papel manteiga ou papel alumínio e adicionados em um único frasco (normalmente em béquer), hidratar em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.
- Sempre que for necessário, levar o meio para fundir, usar vidro Pyrex®, aquecer sobre a tela de amianto ou similar e tripé, no bico de Bunsen ou, se permitido, em micro-ondas.
- Usar sempre luvas térmicas apropriadas para laboratório para manipular vidrarias quentes;
- Sempre que for usado o termo “*esterilizar em autoclave*”, o tempo de esterilização e a temperatura deve ser compatível com o meio a ser produzido, conforme orientação do fabricante.
- Sempre que for usado o termo “*esterilizar por filtração*”, usar o filtro com porosidade de 0,22 micra, recomendado para partículas bacterianas.
- Quando distribuir o meio antes de autoclavar, os tubos não precisam estar esterilizados;
- Quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis.
- Os meios devem ser autoclavados com as tampas semiabertas, para que a esterilização seja por igual

1-PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

em todo o conteúdo dos tubos - tampas fechadas não permitem a entrada do vapor.

CONTROLE DE QUALIDADE, ESTERILIDADE E CRESCIMENTO

- Para controle dos meios confeccionados, incubar placas ou tubos não inoculados à 36 ± 1 °C por 24 horas.
- Não deve haver mudança de cor nem crescimento de qualquer colônia.
- Para o controle de crescimento, sempre que possível usar cepas ATCC, que são cepas de referências de origem e padrão definido de provas para a sua caracterização.
- Se não for possível o uso de cepas ATCC, usar cepas 100% positivas para os controles de qualidade de crescimento realizados.

RECOMENDAÇÕES GERAIS

- Evitar usar meios vencidos (liofilizados e prontos para uso); se usar, certificar-se com o controle de crescimento de que realmente está funcionando.
- Não usar meios prontos para uso em tubos ou placas que estejam ressecados.

- Observar com atenção para as instruções de alguns inóculos que são específicos para alguns meios de cultura.
- Recomenda-se o uso de tubos com tampa de rosca, pois evitam o ressecamento rápido do meio (tamanho dos tubos utilizados geralmente são de 11 por 100 mm).
- Todos os meios confeccionados devem ser devidamente identificados com o nome, data de fabricação e data de validade.
- Todos os meios de placa devem ser embalados em filme plástico PVC transparente para evitar o ressecamento.
- Evitar o uso de sacos plásticos para embalar as placas, pois a água de condensação formada facilita a proliferação de fungos; para meios de cultura em tubos, colocar em sacos plásticos, procurando tirar o excesso de ar. Convém guardar os tubos com meios preparados em sacos plásticos, para sua maior segurança.

2- CONTAGEM TOTAL DE MICROORGANISMOS EM ÁGUA UTILIZANDO O MEIO ÁGAR NUTRIENTE

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO:

Aplica-se à enumeração de bactérias em água potável tratada, incluindo também águas minerais engarrafadas.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES:

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS:

Balança semianalítica; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 22 °C +/- 1 °C, e a 36 °C +/- 1 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS:

Ágar Nutriente – Extrato de levedura; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Efetuar a suspensão inicial da amostra e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.2 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 1 mL de amostra em duplicata em placas de petri identificadas.

Verter de 15 a 20 mL de ágar sobre a amostra, homogeneizar e esperar a solidificar em superfície plana.

5.3 INCUBAÇÃO

Incubar a metade das placas de petri invertidas a 36 +/- 1 °C, durante 44 +/- 4 horas, e a outra parte a 22 +/- 1 °C, durante 68 +/- 4 horas.

5.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Contar as colônias presentes nas placas e calcular o número estimado de colônias presentes em 1 mL de amostra.

**2- CONTAGEM
TOTAL DE
MICROORGANISMOS
EM ÁGUA
UTILIZANDO
O MEIO ÁGAR
NUTRIENTE**

5.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Expressar o resultado em UFC/mL.

Não havendo crescimento bacteriano, expressar os resultados como não detectados em 1 mL. Havendo mais de 300 colônias nas placas com as maiores diluições, expressar o resultado como >300.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 6222:1999.

7 REGISTROS

Não aplicável.

3- CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM PRODUTOS COM ATIVIDADE DE ÁGUA MENOR OU IGUAL A 0,95

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à enumeração de bolores e leveduras em produtos cuja atividade de água seja menor ou igual a 0,95.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança semianalítica; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; incubadora a 25 °C +/- 1 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Ágar Base Glicerol Diclorano (DG18); Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; pinça, bisturi e cabo para este, estéreis; saqueta plástica estéril; ponteira de 1 mL estéril; alça de drigalski estéril; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 CONCEITOS

Colônia

Acúmulo de massa microbiana localizada e visível desenvolvida sobre ou dentro de meio nutriente sólido a partir de uma partícula viável.

Leveduras

Microrganismos aeróbicos mesofílicos, os quais, a 25°C em meio ágar micológico sob as condições estabelecidas nesta parte da ISO 21527, desenvolvem colônias redondas, foscas ou não, sobre a superfície do meio, geralmente possuindo borda regular e superfície medianamente convexa.

Bolores

Microrganismos filamentosos, mesofílicos e aeróbicos, os quais, em meio ágar micológico sob as condições estabelecidas nesta parte da ISO 21527, desenvolvem propágulos/gametângios ou colônias, achatados ou aveludados, geralmente com corpos de frutificação ou esporos coloridos.

3- CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM PRODUTOS COM ATIVIDADE DE ÁGUA MENOR OU IGUAL A 0,95

5.2 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra e/ou efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.3 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 0,1 mL de amostra na superfície do ágar nas placas de petri identificadas.

Espalhar o inóculo com alça de drigalski.

5.4 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri sem inverter a 25 +/-1 °C, durante 5 a 7 dias. No caso de suspeita de *Xeromices bisponi*, incubar por 10 dias.

5.5 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Contar as colônias presentes nas placas contendo até 150 colônias.

Bolores e leveduras devem ser contados separadamente.

5.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Expressar o resultado em UFC/mL ou UFC/g.

NOTA: manipular as placas com cuidado devido a facilidade da dispersão de esporos no ar.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 21527-2:2008.

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

4- CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM PRODUTOS COM ATIVIDADE DE ÁGUA MAIOR QUE 0,95

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à enumeração de bolores e leveduras em produtos cuja atividade de água seja maior que 0,95.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS:

Balança semianalítica; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; incubadora a 25 °C +/- 1 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS:

Ágar Base Diclorano Rosa de Bengala com Cloranfenicol (DRBC); Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; pinça, bisturi e cabo para este, estéreis; saqueta plástica estéril; ponteira de 1 mL estéril; alça de drigalski estéril; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 CONCEITOS

Colônia

Acúmulo de massa microbiana localizada e visível desenvolvida sobre ou dentro de meio nutriente sólido a partir de uma partícula viável.

Leveduras

Microrganismos aeróbicos mesofílicos, os quais, a 25 °C em meio ágar micológico sob as condições estabelecidas nesta parte da ISO 21527, desenvolvem colônias redondas, foscas ou não, sobre a superfície do meio, geralmente possuindo borda regular e superfície medianamente convexa.

Bolores

Microrganismos filamentosos, mesofílicos e aeróbicos, os quais, em meio ágar micológico sob as condições estabelecidas nesta parte da ISO 21527, desenvolvem propágulos/gametângios ou colônias, achatados ou aveludados, geralmente com corpos de frutificação ou esporos coloridos.

4- CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM PRODUTOS COM ATIVIDADE DE ÁGUA MAIOR QUE 0,95

5.2 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra e/ou efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.3 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 0,1 mL de amostra na superfície do ágar nas placas de petri identificadas.

Espalhar o inóculo com alça de drigalski.

5.4 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri sem inverter a 25 +/-1 °C, durante 5 dias.

5.5 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Contar as colônias presentes nas placas contendo até 150 colônias.

Bolores e leveduras devem ser contados separadamente.

5.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Expressar o resultado em UFC/mL ou UFC/g.

NOTA: manipular as placas com cuidado devido a facilidade da dispersão de esporos no ar.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA:

Norma ISO 21527-1:2008.

7 REGISTROS:

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

5- CONTAGEM DE *ENTEROBACTERIACEAE*

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à enumeração de colônias de *Enterobacteriaceae* em análises microbiológicas.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC 018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; incubadora a 37 °C +/- 1 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS:

Ágar VRBG; ágar Nutriente; ágar Glicose; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; pinça, bisturi e cabo para este, estéreis; saqueta plástica estéril; ponteira de 1 mL estéril; alça de drigalski estéril; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra e / ou efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.2 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 1 mL de amostra na placa de petri identificada.

Verter 10 mL de ágar VRBG sobre o inóculo e homogeneizar. Deixar solidificar e verter mais 15 mL de ágar como cobertura para criar uma ambiente de semianaerobiose.

5.3 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri invertidas a 37 +/-1 °C, durante 24 +/- 2 horas.

5- CONTAGEM DE *ENTEROBACTERIACEAE*

5.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Selecionar as placas contendo até 150 colônias características (rosa até vermelho ou roxa, com ou sem halo).

Contar as colônias características e selecionar aleatoriamente 5 destas para repique.

Estriar as colônias selecionadas sobre o ágar nutriente e incubar a 37 +/-1 °C, durante 24 +/- 2 horas.

Realizar o teste de oxidase, estriando uma colônia sobre a tira teste. Não havendo mudança de cor, conforme indicação do fabricante das tiras, considerar o teste negativo.

5.5 TESTE DE FERMENTAÇÃO

Com agulha de inoculação, semear as colônias negativas para oxidase, em tubos com ágar glicose e incubá-los a 37 +/-1 °C, durante 24 +/- 2 horas.

O desenvolvimento de uma coloração amarelada no meio indica resultado positivo.

5.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Colônias glicose positivas e oxidase negativas são consideradas *Enterobacteriaceae*.

Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 21528-2:2004.

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

6- CONTAGEM PADRÃO DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS ESTRITOS E FACULTATIVOS VIÁVEIS

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis em amostras matérias-primas, alimentos e água.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; Equipamento de homogeneização; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 36 +/- 1 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Ágar PCA; Solução de TTC; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra, e efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.2 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 1 mL de amostra e das diluições necessárias em placas de petri identificadas.

Verter de 15 a 20 mL de ágar PCA sobre a amostra, homogeneizar e esperar solidificar.

5.3 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri invertidas a 36 +/-1 °C, durante 48 horas.

5.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Selecionar as placas para leitura, da seguinte forma:

Entre 25 e 250 colônias para produtos em geral e entre 20 e 300 colônias para água.

**6- CONTAGEM
PADRÃO DE
MICROORGANISMOS
MESÓFILOS
AERÓBIOS
ESTRITOS E
FACULTATIVOS
VIÁVEIS**

5.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Contar as colônias e expressar o resultado em UFC/g ou mL.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA:

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
IN Nº 62, 26 de agosto de 2003.

7 REGISTROS:

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

7- CONTAGEM TOTAL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à contagem de coliformes totais e termotolerantes em alimentos, matérias-primas e rações que contenham limite máximo igual ou superior a 100 UFC/g ou mL de amostra.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; Equipamento de homogeneização; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 36 +/- 1 °C; banho-maria a 45 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Ágar VRB; Caldo Verde Brilhante Bile 2% lactose; Caldo EC; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra, e efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.2 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 1 mL de amostra e das diluições desejadas em placas de petri identificadas.

Verter 15 mL de ágar VRBA sobre a amostra, homogeneizar e esperar solidificar. Adicionar mais 10 mL de VRBA formando uma sobrecamada.

5.3 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri invertidas a 36 +/- 1 °C, durante 18 a 24 horas.

5.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Selecionar as placas para leitura, as placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

7- CONTAGEM TOTAL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Contar as colônias típicas, ou seja, as que apresentarem cor rósea, com 0,5 a 2 mm de diâmetro, rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio. Anotar os resultados da contagem.

Contar colônias típicas e atípicas separadamente e prosseguir com a confirmação, selecionando de 3 a 5 colônias dos dois tipos para repique.

Inocular cada colônia em tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose e tubos de Durham, e incubar a 36 +/- 1 °C por 24 a 48 horas.

A presença de coliformes totais é confirmada através da formação de gás em pelo menos 1/10 do tubo de Durham, ou ainda, pela efervescência quando agitado gentilmente.

Anotar o resultado para cada colônia utilizada, bem como a sua diluição.

Tubos que apresentarem resultado negativo após 24 horas deverão ser incubados por mais 24 horas.

Coliformes Termotolerantes:

Inocular as colônias suspeitas em tubos contendo caldo EC com tubos de Durham, e incubar a 45 +/- 2 °C, por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação.

O resultado positivo é dado da mesma forma que na confirmação de coliformes totais (ou por formação de gás, ou efervescência).

Da mesma forma, se não houver formação de gás em 24 horas, as amostras deverão ser reincubadas por mais 24 horas.

5.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Para cálculo dos resultados, consultar o Anexo IV da IN 62 “Procedimento para contagem de colônias”, e expressar o resultado em UFC/g ou mL.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA:

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
IN Nº 62, 26 de agosto de 2003.

7 REGISTROS:

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

8- NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM ÁGUA

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes em água e gelo usados em estabelecimentos produtores de alimentos.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 36 +/- 1 °C; banho-maria a 45 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Caldo Lauryl Sulfato de Sódio concentração simples e dupla; Caldo Verde Brilhante Bile 2% lactose; Caldo EC; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PREPARO DE AMOSTRA

Preparar a amostra de água de acordo com as instruções contidas nas ISOS 6887 e 7218.

No caso de amostras de gelo, quando encaminhadas em frascos de boca larga, deixar descongelar no próprio frasco, sob refrigeração, pelo período necessário para seu completo descongelamento.

Antes do início da análise, homogeneizar bem.

Quando o gelo for encaminhado em sacos plásticos, colocar a amostra dentro de outro saco plástico resistente (sem perfurações) e deixar descongelar, sob refrigeração, pelo período necessário para seu completo descongelamento.

Após descongelamento total, verificar a presença de água no saco plástico de proteção da amostra, o que indica a presença de perfurações na embalagem do gelo. Nesse caso, não analisar a amostra.

Da mesma forma, as amostras de gelo que chegarem descongeladas ou em descongelamento deverão ser descartadas.

8- NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM ÁGUA

Quando a embalagem da amostra de gelo mostrar evidências de que não continha perfurações, após o descongelamento total, homogeneizar bem e proceder à análise, seguindo o procedimento estabelecido para amostras de água.

5.2 INOCULAÇÃO

Dispensar 10 mL da amostra em uma série de 3 tubos contendo lauryl sulfato de sódio em concentração dupla.

Inocular 1 mL em uma série de 3 tubos contendo lauryl sulfato de sódio em concentração simples.

Efetuar uma diluição decimal e dispensar 1 mL desta em outra série de 3 tubos contendo lauryl sulfato de sódio em concentração simples.

5.3 INCUBAÇÃO

Incubar os tubos a 36 +/- 1 °C, por 24 a 48 horas.

5.4 LEITURA

A positividade para coliformes totais é dada pela formação de gás (pelo menos 1/10) nos tubos de Durham e por efervescência sob gentil agitação da amostra.

Anotar o número de tubos positivos para cada série.

Repicar dos tubos de lauryl sulfato de sódio para tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose e tubos de Durham, e incubar a 36 +/- 1°C por 24 a 48 horas.

5.4.1 CONFIRMAÇÃO DE TOTAIS

A presença de coliformes totais é confirmada através da formação de gás em pelo menos 1/10 do tubo de Durham, ou ainda, pela efervescência quando agitado gentilmente.

Anotar o número de tubos positivos para cada série de diluição.

Tubos que apresentarem resultado negativo após 24 horas deverão ser incubados por mais 24 horas.

5.4.2 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

Repicar dos tubos de lauryl sulfato de sódio para tubos contendo caldo EC com tubos de Durham, e incubar a 45 +/- 0,2 ° C, por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação.

O resultado positivo é dado da mesma forma que na confirmação de coliformes totais (ou por formação de gás, ou efervescência).

Da mesma forma, se não houver formação de gás em 24 horas, as amostras deverão ser reincubadas por mais 24 horas.

8- NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM ÁGUA

5.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos, verificar o Número Mais Provável (NMP) de acordo com a tabela correspondente no BAM.

Expressar o valor obtido em NMP/100 mL.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
IN N° 62, 26 de agosto de 2003.

BAM. **Bacteriological Analytical Manual.** [*Online*].

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

9- CONTAGEM DE *STAPHYLOCOCCUS* AUREUS EM ÁGAR BAIRD- PARKER

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à baixa contagem de *Staphylococcus aureus* em análises microbiológicas, com ágar Baird-Parker.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa a 35°C +/- 1 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Ágar Baird-Parker; Caldo BHI; Coagulasma; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; pinça, bisturi e cabo para este, estéreis; bolsa plástica estéril; ponteira de 1 mL estéril; alça de drigalski estéril; tubos de ensaio; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a amostra e/ou efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.2 INOCULAÇÃO EM PLACAS

Dispensar 0,1 mL da suspensão inicial ou da própria amostra, se líquida, em placas contendo ágar Baird-Parker, espalhando o inóculo com a alça de Drigalski.

5.3 INCUBAÇÃO

Incubar as placas invertidas a 35 °C por 24 +/- 2 horas.

Olhar as placas e marcar, no fundo das mesmas quaisquer colônias atípicas presentes.

Reincubar por mais 24 +/- 2 horas, e marcar as colônias típicas e atípicas.

9- CONTAGEM DE *STAPHYLOCOCCUS* **AUREUS EM** **ÁGAR BAIRD- PARKER**

5.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS

Contar as colônias apenas nas placas com no máximo 300 colônias, e destas, até 150 típicas e/ou atípicas em duas diluições sucessivas.

Para enumeração de baixos valores de estafilococos coagulase positiva, confirmar todas as colônias presentes.

As colônias típicas de estafilococos coagulase positiva podem ser pretas ou cinzas, brilhantes e convexas, com 1 a 1,5 mm de diâmetro. São circundadas por um halo translúcido, que pode conter outro halo opalescente, justaposto à colônia.

As colônias atípicas podem ser pretas e brilhantes, com ou sem borda branca bem marcada, ausência ou difícil visualização de área translúcida ou de halo opalescente, ou ainda, podem ser cinza, sem zonas claras ou translúcidas.

5.4 CONFIRMAÇÃO

Selecionar 5 colônias típicas e 5 atípicas para semear em tubos contendo caldo BHI, e incubar a 35 ou 37 °C por 24 +/- 2 horas.

Adicionar, em tubos estéreis, 0,1 mL da cultura a 0,3 mL de coagulasma e incubar a 35 ou 37 °C, por 4 a 6 horas. Verificar os tubos, inclinando-os para ver se houve coagulação.

Em caso negativo, reanalisar após 24 horas de incubação, ou após tempos de incubação descritos pelo fabricante.

Como controle, inocular 0,1 mL de caldo BHI em 0,3 mL de coagulasma. Esta amostra não poderá sofrer coagulação para que as análises sejam válidas.

Considerar como positivos, os testes em que o coágulo ocupa mais da metade do volume original.

5.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Calcular o número de colônias positivas conforme cálculo descrito na ISO 6888-1:1999.

Quando o número de colônias confirmadas for igual ao número de colônias selecionadas e repicadas, o resultado será igual à contagem inicial, levando-se em consideração a diluição utilizada.

Quando o número de colônias confirmadas for diferente do número de colônias selecionadas e repicadas, calcular a proporção de colônias positivas conforme cálculo descrito na ISO 6888-1:1999.

O resultado final será a soma dos resultados de colônias típicas e atípicas confirmadas.

Expressar o resultado como:

Contagem de *Staphylococcus aureus*: $X \times 10^y$ UFC/g ou mL ou Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva: $X \times 10^y$ UFC/g ou mL..

**9- CONTAGEM DE
STAPHYLOCOCCUS
AUREUS EM
ÁGAR BAIRD-
PARKER**

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 6888-1:1999.

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

10- DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao cultivo e isolamento de *Listeria monocytogenes* em análises microbiológicas de alimentos.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; Homogeneizador de amostras (stomacher); agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 36 °C +/- 1 °C, e a 41,5 °C +/- 1 °C; banho-maria a 37 +/- 1°C.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Ágar Oxford; ágar Palcam; ágar Triptona Soja Extrato de levedura; ágar Sangue de Carneiro; ágar de Motilidade; Caldo Demi Fraser; Caldo Fraser; Caldo Triptona Soja Extrato de levedura; Caldo de utilização de carboidratos (Xilose e Rhamnose); Meio CAMP; Solução de peróxido de hidrogênio; Solução salina de tampão fosfato (PBS); Álcool 70%; algodão; placas de petri; pinça estéril; bisturi e cabo para o mesmo, estéreis; tábua de fatiar estéril, bolsa plástica estéril; ponteiras de 1 mL, estéreis.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DA AMOSTRA

Pesar a alíquota de amostra representativa para o produto em uma saqueta estéril.

5.2 PRÉ- ENRIQUECIMENTO

Verter o caldo Demi Fraser, respeitando a porção de 1/10 (amostra/diluyente), dentro da bolsa contendo a amostra, homogeneizar no stomacher e incubar a 30 °C, por 24 +/- 2 horas.

5.3 ENRIQUECIMENTO SELETIVO

Inocular 0,1 mL deste preparado em tubos contendo 10 mL de caldo Fraser e incubar a 35 ou 37°C, durante 48 +/- 2 horas.

10- DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

5.4 ISOLAMENTO

Estriar, em Palcam e Oxford, uma alçada da amostra enriquecida no meio Demi Fraser e no meio Fraser.

Incubar as placas com o primeiro meio seletivo invertidamente em estufa a 30, 35 ou 37 °C, e as placas com o segundo meio em jarras de microaerobiose ou anaerobiose por 24 horas, podendo haver até 24 horas adicionais, caso o crescimento seja sutil ou nulo após as primeiras 24 horas.

Examinar as placas e observar colônias típicas de *Listeria* spp.

NOTA: Colônias típicas de *Listeria* spp. no ágar Oxford são pequenas, possuem cor acinzentada, com um halo enegrecido. Após 48 horas as colônias tornam-se mais escuras podendo apresentar um brilho esverdeado, um pouco maiores, com halo enegrecido e centro côncavo.

Para o ágar Palcam em microaerobiose, expor as placas ao ar por 1 hora, para que retomem a cor róseo-arroxeadada. Após 24 horas as colônias típicas apresentam coloração verde-acinzentada, com 1,5 a 2 mm de diâmetro, algumas vezes com centro negro e

sempre com halos enegrecidos. Após 48 horas, as colônias são verdes, côncavas no centro e circundadas por um halo negro.

5.5 CONFIRMAÇÃO DE *LISTERIA* SPP

Selecionar, de cada meio seletivo, pelo menos cinco colônias típicas. Caso haja menos de cinco, utilizar todas as que houver.

Estriar as colônias selecionadas em placas contendo ágar Triptona Soja Extrato de Levedura, de forma a se formarem colônias isoladas e incubar, invertidamente a 35 ou 37 °C, por 18 a 24 horas, ou até que haja crescimento satisfatório.

As colônias típicas serão convexas, opacas sem cor e com borda lisa, medindo cerca de 1 a 2 mm de diâmetro. Utilizar estas colônias para os testes confirmativos.

5.5.1 REAÇÃO DE CATALASE

Suspender uma alçada de colônia sobre algumas gotas de peróxido de hidrogênio vertidas em lamina microscópica ou placa de petri e observar. A formação de borbulhas indica reação positiva.

5.5.2 COLORAÇÃO DE GRAM

Listeria spp. é Gram positiva, em forma de bastonetes curtos e finos.

10- DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

5.5.3 TESTE DE MOTILIDADE (SE NECESSÁRIO)

Inocular uma colônia isolada em um tubo contendo caldo Triptona Soja Extrato de Levedura, e incubar a 25 °C, por 8 a 24 horas, ou até haver turbidez do meio.

Transferir uma alçada para lâmina microscópica e sobre a cultura, colocar a lamínula. Observar no microscópio. *Listeria* spp. Apresenta a forma de bastonete fino e curto com movimentação flagelar rotatória ou de tombamento.

Com uma alçada da cultura, perfurar o ágar teste de motilidade e incubar a 25 °C por 48 horas.

Observar o crescimento ao redor da perfuração. *Listeria* spp. apresenta crescimento em forma de guarda-chuva.

Não havendo crescimento suficiente, incubar por até 5 dias e observar novamente.

5.5.4 CONFIRMAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

5.5.4.1 TESTE DE HEMÓLISE

Inocular em placas de ágar Sangue, uma alçada da cultura típica, perfurando também o ágar. Incubar a 35 ou 37 °C, por 24 +/- 2 horas.

Listeria monocytogenes apresenta zonas claras , estreitas e translúcidas.

5.5.4.2 UTILIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Inocular, em cada um dos meios de utilização de carboidratos, uma alçada da cultura obtida no caldo Triptona Soja Extrato de Levedura e incubar a 35 ou 37 °C, por até 5 dias. A reação positiva é indicada pela cor amarela, que ocorrerá principalmente nas primeiras 24 a 48 horas.

5.5.4.3 TESTE CAMP

Semear culturas de *S. aureus* e *Rhodococcus equi* em linhas únicas sobre o ágar sangue, de maneira paralela e diametralmente oposta.

Semear culturas obtidas no ágar Triptona Soja Extrato de levedura perpendicularmente as culturas descritas no item anterior, mantendo uma distância de 1-2 mm destas. Estriar linhagens controle de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*. Incubar as placas a 35 ou 37 °C, por 18 a 24 horas.

Considera-se positiva a reação quando forma-se uma zona de hemólise aumentada na intersecção entre as linhagens-teste e as linhagens de *S. aureus* e *R. equi*.

5.5.4.4 CONFIRMAÇÃO DEFINITIVA

Enviar as culturas para um laboratório de sorotipagem ou, possivelmente tipagem lisogênica.

**10- DETECÇÃO
E ENUMERAÇÃO
DE *LISTERIA*
*MONOCYTOGENES***

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 11290-1:1996.

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

11- DETECÇÃO DE *SALMONELLA*

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao cultivo e isolamento de *Salmonella* spp. em análises microbiológicas de alimentos.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; Homogeneizador de amostras (stomacher); agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 36 °C +/- 1 °C, e a 41,5 °C +/- 1 °C; banho-maria a 37 +/- 1°C.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Ágar XLD; outro ágar para *Salmonella*; Água peptonada tamponada; Caldo Rappaport Vassiliadis Soja; ágar TSI; Meio de descarboxilação L - lisina; Meio VP; ágar Ureia; ágar Nutriente; Reagentes β – Galactosidase; Tolueno; Triptona/Triptofano; Álcool 70%; algodão; placas de petri; pinça estéril; bisturi e cabo para o mesmo, estéreis; tábua de fatiar estéril, saqueta plástica estéril; alça de inoculação; ponteiras de 1 mL, estéreis.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DE AMOSTRA

Pesar a alíquota de amostra representativa para o produto em uma saqueta estéril.

5.2 PRÉ- ENRIQUECIMENTO

Verter a água peptonada tamponada, respeitando a porção de 1/10 (amostra/diluyente), dentro da saqueta contendo a amostra.

Homogeneizar no stomacher e incubar a 37+/- 1 °C, por 18+/- 2 horas.

5.3 ENRIQUECIMENTO SELETIVO

Inocular 0,1 mL deste preparado em tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis Soja e incubar a 41,5+/-1 °C, durante 24 +/- 3 horas.

11- DETECÇÃO DE *SALMONELLA*

5.4 ISOLAMENTO

Estriar, em ágar XLD e XLT4, uma alçada da amostra enriquecida no meio RVS e incubar as placas invertidas a 37+/- 1 °C, por 24+/- 3 horas.

Examinar as placas e observar colônias típicas e atípicas que possam ser *Salmonella* e marcá-las, no fundo da placa.

NOTA: Colônias típicas de *Salmonella* no ágar XLD, possuem centro negro, com halo rosado em seu entorno; *Salmonellas* variantes negativas de H₂S, são rosas, com um rosa mais intenso no meio da colônia; *Salmonella* lactose-positiva é amarela, com ou sem escurecimento.

5.5 SELEÇÃO

Selecionar, de cada meio seletivo, pelo menos uma colônia típica ou suspeita, e, em seguida, mais quatro colônias, caso a primeira seja negativa.

Estriar as colônias selecionadas em placas contendo ágar nutriente, de forma a se formarem colônias isoladas e incubar, as placas invertidas a 37+/- 1 °C, por 24+/- 3 horas.

5.6 CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

5.6.1 ÁGAR TSI

Estriar, a partir de picada no fundo do bisel, uma alçada da cultura obtida em ágar TSI inclinado e incubar a 37+/- 1 °C, por 24+/- 3 horas.

Interpretação:

a) fundo:

amarelo – glicose positiva (utilizada).

vermelho ou inlaterada – glicose negativa (não utilizada).

preto – sulfeto de hidrogênio (formado).

bolhas ou fendas – formação de gás da glicose.

b) superfície:

amarelo – lactose e/ou sacarose positiva (utilizadas).

vermelho ou inalterada – lactose e sacarose negativas.

Culturas típicas de *Salmonella* mostram inclinação alcalina (vermelho) e ácida (amarelo) no fundo com formação de gás. Em cerca de 90% dos casos há formação de H₂S, com escurecimento do ágar.

Para *Salmonella* lactose-positiva, a parte inclinada do TSI fica amarela, portanto, faz-se necessária a continuidade dos testes confirmativos.

5.6.2 ÁGAR UREIA

Estriar, em superfície inclinada do ágar Ureia e incubar a 37+/- 1 °C, por 24+/- 3 horas, examinando em intervalos.

Se a reação for positiva, a divisão da Ureia libera amônia e a cor do meio é alterada para rosa e

11- DETECÇÃO DE *SALMONELLA*

posteriormente para cereja escuro. A reação, muitas vezes, já é visível após 2 a 4 horas de incubação.

5.6.3 MEIO DE DESCARBOXILAÇÃO L-LISINA

Inocular imediatamente abaixo da superfície do meio líquido e incubar a 37+/- 1 °C, por 24+/- 3 horas.

A turvação da cor roxa dá o resultado por positivo, e a coloração amarela indica reação negativa.

5.6.4 DETECÇÃO DE β – GALACTOSIDASE

Suspender uma alçada da colônia suspeita em um tubo contendo 0,25 mL de solução salina.

Adicionar uma gota de tolueno e agitar o tubo, colocando-o em banho-maria a 37 °C por 5 minutos.

Adicionar 0,25 mL de reagente para detecção de β – Galactosidase e misturá-lo.

Recolocar no banho-maria e deixar até 24 +/- 3 horas examinando em intervalos.

A cor amarela indica reação positiva e é possível de ser detectada após 20 minutos. Se utilizar discos de papel, seguir a instrução de uso do fabricante.

5.6.5 MEIO DE REAÇÃO VP – VOGES PROSKAUER

Suspender em tubo estéril com 3 mL do meio, uma alçada da colônia suspeita e incubar a 37+/- 1 °C, por 24+/- 3 horas. Após, adicionar duas gotas de

creatina, três gotas de solução alcoólica de 1-naftol e, em seguida, duas gotas de solução de hidróxido de potássio, agitando após a adição de cada reagente.

A mudança da cor rosa para a cor vermelha brilhante dentro de 15 minutos indica reação positiva.

5.6.6 MEIO PARA REAÇÃO DE INDOL

Inocular um tubo contendo 5 mL de triptona/ triptofano com a colônia suspeita e incubar a 37+/- 1 °C, por 24+/- 3 horas.

Adicionar 1 mL do reagente de Kovacs.

A formação de um anel vermelho indica uma reação positiva. Um anel amarelo-marrom indica reação negativa.

Consultar Tabela 1 – ISO 6579:2002, para interpretação das reações da *Salmonella*.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 6579:2002.

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

12- CONTAGEM DE *BACILLUS* CEREUS POR INCUBAÇÃO A 30 °C

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à baixa contagem de *Bacillus cereus* em análises microbiológicas, pelo método de incubação a 30 °C.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; agitador de tubos; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa a 30°C +/- 1 °C; banho-maria a aproximadamente 80 °C; microscópio.

4 REAGENTES E MATERIAIS

Ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP); ágar sangue de carneiro; Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; pinça, bisturi e cabo para este, estéreis; bolsa plástica estéril; ponteira de 1 mL estéril; alça de drigalski estéril; tubos de ensaio; lâminas de microscópio e óleo de imersão; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DA AMOSTRA

Pesar a amostra e / ou efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.2 INOCULAÇÃO

Dispensar 0,1 mL da suspensão inicial ou da própria amostra, se líquida, em duas placas contendo ágar MYP, espalhando o inóculo. Incubar invertidamente a 30 °C por 18 a 24 horas.

Após a incubação, analisar a presença de colônias típicas e atípicas.

Em MYP, as colônias possuem de 2 a 5 mm de diâmetro e são irregulares. Sua coloração é rosa contra um fundo carmesim, circundadas por um halo de precipitação de até 5 mm de extensão.

Em casos duvidosos a confirmação deve ser feita de qualquer forma.

12- CONTAGEM DE *BACILLUS* CEREUS POR INCUBAÇÃO A 30 °C

5.3 CONFIRMAÇÃO EM ÁGAR SANGUE DE CARNEIRO

Estriar as colônias suspeitas em placas contendo ágar sangue e incubar a 30 °C, por 24 +/- 2 horas e verificar a hemólise, através do clareamento do entorno das colônias.

Calcular o total de colônias de *B. cereus* conforme ISO 7218:1996/Emenda 1:2001.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 7932:2004.

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

13- CONTAGEM DE *CLOSTRIDIUM* *PERFRINGENS*

1 OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à enumeração por contagem em placa de *Clostridium perfringens* em análises microbiológicas.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

ISO 6887- Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO 7218, Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais para análises microbiológicas.

ISO 8261, Leite e produtos derivados – Guia geral para preparação de amostras-teste, suspensão inicial e diluições decimais para análises microbiológicas.

ISO/TS 11133 - Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Orientações gerais na preparação e produção de meios de cultura.

IT MIC018 e IT MIC019.

3 EQUIPAMENTOS

Balança de precisão; Equipamento de homogeneização; banho – maria a 46 °C;

jarras de anaerobiose; bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar; micropipetador de 0,1 a 1 mL; estufa bacteriológica a 37 +/- 1 °C.

4 REAGENTES E MATERIAIS:

Ágar sulfito-cicloserina (SC); Solução D-Cicloserina (adicionar 1 mL a cada 100 mL de ágar, antes de plaqueá-lo); Meio fluido Thioglicato; Meio Lactose Sulfito;

Álcool 70%; solução salina peptonada 0,1%; algodão; placas de petri.

5 DESCRIÇÃO/PROCEDIMENTO

5.1 PESAGEM E PREPARO DA AMOSTRA

Pesar a amostra, e efetuar sua suspensão inicial e suas diluições decimais conforme necessidade.

5.2 INOCULAÇÃO

Dispensar em duplicata, 1 mL de amostra em placas de petri identificadas.

Verter cerca de 15 mL de ágar SC sobre a amostra, homogeneizar e esperar solidificar. Verter mais 5 a 10 mL de ágar como cobertura.

5.3 INCUBAÇÃO

Incubar as placas de petri invertidas em jarras de anaerobiose a 37 +/-1 °C, durante 20 +/- 2 horas.

13- CONTAGEM DE *CLOSTRIDIUM* *PERFRINGENS*

5.4 CONTAGEM DE COLÔNIAS

Selecionar as placas contendo menos de 150 colônias, e se possível, placas representando diluições sucessivas.

Contar as colônias presumidamente de *C. perfringens*.

5.5 CONFIRMAÇÃO

Selecionar 5 colônias de cada amostra para confirmação.

5.5.1 CONFIRMAÇÃO USANDO MEIO LACTOSE SULFITO (LS)

Inocular cada uma das colônias em meio fluido thioglicolato, e incubar em anaerobiose a 37 °C por 18 a 24 horas.

Transferir assepticamente, 5 gotas da cultura para tubos contendo o meio LS com tubos de Durham e incubar aerobicamente a 46 °C por 18 a 24 horas em banho-maria.

Verificar a presença de gás nos tubos de Durham e a coloração preta.

Tubos de Durham contendo mais de ¼ de gás e com coloração preta do meio são considerados positivos.

Em caso de dúvida, transferir assepticamente 5 gotas da cultura do meio LS para outro tubo contendo o

meio LS com tubo de Durham e incubar aerobicamente a 46 °C por 18 a 24 horas em banho-maria, analisando quanto às mesmas determinantes.

6 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Norma ISO 7937:2004.

7 REGISTROS

Não aplicável.

8 ANEXOS

Não aplicável.

