

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROJETO DESPERTANDO PARA A CIÊNCIA

AULA PRÁTICA DE MICROBIOLOGIA
Padronização de inóculo para processos fermentativos

Prof^ª. Dr^ª: Mareci Mendes de Almeida

Prof^ª. Dr^ª: Nelci Catarina Chiquetto

Aline Oksana Sikorski

Daiane Caroline Costa Pedrozo

ATIVIDADE PRÁTICA

Preparo do inóculo

- Para preparar 200 ml do caldo YEPD, pesa-se:

- 4g de glicose
- 4g de peptona
- 2g de extrato de levedura

- Diluem-se os compostos em 200 ml de água destilada.

- No caso da contagem por plaqueamento, adiciona-se a 100 ml do caldo YEPD a quantidade de 1,5 a 1,7g de Ágar, após misturar leva-o para banho-maria até diluição completa (aspecto cristalino).

- Os meios de cultura quando preparados devem ser protegidos com tampões e papel Kraft em seguida autoclavados para esterilização durante 20 minutos a 120°C.

- Depois de esterilizados adiciona-se 0,5g de levedura (fermento liofilizado) e deixa na estufa de inoculação por 24 horas.

Contagem de leveduras

Preparo da câmara de Neubauer e colocação da amostra

Lavar a câmara de Neubauer com água destilada e passar álcool 70 %, em seguida secar com papel macio tomando cuidado para deixar bem seco e não grudar nenhum fiapo de papel na câmara. Faz-se o mesmo procedimento com a lamínula. Fixar a lamínula com água nas laterais da câmara.

Com uma micropipeta de 100 μL ou 50 μL , coleta-se a amostra a ser analisada e deposita-se cuidadosamente entre a câmara e a lamínula tomando cuidado para preencher totalmente o volume da câmara sem deixar vaziar e/ou cair amostra sobre a lamínula. Para tanto deve-se aproximar a pipeta da câmara, com uma gota na ponta, sem encostar na lamínula, o suficiente para que a amostra seja arrastada por capilaridade.

Técnica microscópica - contagem em câmara de Neubauer

- Diluir a cultura 1:100 (10^{-2}) em água peptonada 0,1%;
- Colocar em um tubo 1 ml do corante (corante azul de metileno 0,01% + citrato de sódio 2%);
- Com pipeta Pasteur montar a câmara de Neubauer;
- Levar ao microscópio e usando a objetiva de 40x proceder a contagem das células;
- O número de células contadas pode ser ajustado pela diluição ou não do material analisado, e para melhor precisão da análise a diluição da amostra deverá resultar em torno de 200 células por quadrante.
- Anotar o número de células por campo diferenciando as células viáveis (sem coloração) e as células inativas (coradas), calcular a porcentagem de células viáveis considerando 100% o total de células contadas;
- Fazer a contagem nos quadrantes A e fazer a média dos 4 quadrantes. Utilizando o valor médio por quadrante.
- Para calcular o número de células viáveis/ml:
- Tomar em conta que cada quadrante possui volume de $0,1\text{mm}^3$.

Técnica de plaqueamento

- Placas de Petri e pipetas devem ser esterilizadas embrulhadas em papel ou em recipientes próprios.
- A solução de água peptonada é colocada no volume de 9 mL em tubos. Em seguida tampa-se e esteriliza-se em autoclave.
- A amostra a ser analisada deve ser representativa do ponto selecionado. Das amostras são feitas diluições decimais utilizando-se soluções contidas nos tubos.
- Feitas as diluições, selecionam-se as que serão processadas. A seguir, retira-se uma alíquota do tubo da diluição selecionada e transfere-se para a placa que conterá ou não o meio de cultura, dependendo da técnica a ser aplicada (superfície = 0,1 mL ou “pour plate” = 1 mL).
- Caso a placa não contenha o meio, este deverá ser colocado posteriormente, já liquefeito e a uma temperatura ($\pm 50^{\circ}\text{C}$), vertendo-o sobre a amostra, fazendo-se movimentos em forma de oito para homogeneizá-la no meio antes da solidificação (técnica “*pour plate*”).
- Caso o meio já tenha sido colocado na placa, este deve estar frio e solidificado ao se colocar a amostra na superfície. Neste caso a amostra é espalhada com auxílio de uma espátula de *Drigalsky* (técnica de superfície).
- Marcar na placa o meio, a amostra, a diluição, o volume de amostra e a data do experimento.
- Após estarem solidificadas, as placas então são incubadas a 28°C (leveduras), pode-se aplicar também uma temperatura de 30°C para bactérias e leveduras.
- A incubação deve ser por 24 a 48 horas e, a seguir, as colônias são contadas. O experimento deve sempre ser feito em placas com duplicatas.
- Calcular o número de células viáveis/mL:
$$\text{UFC} = \text{unidades formadoras de colônias}$$