

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

OFICINA 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 Karoline Costa Pedrozo

PONTA GROSSA

2016

ATIVIDADE PRÁTICA

Preparo do inóculo

- Para preparar 200 ml do caldo YEPD, pesa-se 4g de glicose, 4g de peptona e 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 1,5 a 1,7g de Ágar, após misturar leva ao 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

A viabilidade celular é extremamente importante para o desenvolvimento do processo fermentativo, está relacionada com a quantidade de células viáveis, ou seja, as que estão metabolicamente ativas.

A proporção de células viáveis em uma cultura ou processo fermentativo pode ser avaliada pelas técnicas de plaqueamento em meios de cultura adequados ou por observação microscópica usando Câmara de Neubauer e usando coloração das células com azul de metileno. O azul de metileno torna-se incolor na presença de enzimas ativas, então indicando células viáveis. E se permanecer azul significa que a célula não está viável.

As contagens e estudo de viabilidade utilizando corante como azul de metileno são mais utilizadas pela rapidez e facilidade da análise.

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 (ver montagem no item 2.1.1)
- 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 (mostrados na Figura 3) e fazer a média dos 4 quadrantes. Utilizando o valor médio por quadrante.
- Para calcular o número de células viáveis/ml:

Considerando que depois de ler as quatro áreas A (quadrantes) foi feita a média e resultou em 95 células viáveis e foi feita uma diluição de 1:100 ou 10^{-2} ,

sabendo-se que:

1. O volume de cada quadrante é de $0,1 \text{ mm}^3$ ou em $0,0001 \text{ cm}^3$ ou $0,0001 \text{ mL}$ ($1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$)
2. Ao contar o número total de células de um quadrante tem-se o número de células em $0,0001 \text{ mL}$ ou em $1 \times 10^{-4} \text{ mL}$
3. Fazer a seguinte regra de três:

$$\begin{array}{l} 1 \times 10^{-4} \text{ mL} - \text{Número de células contadas (C)} \\ 1 \text{ mL} - N \text{ células} \end{array}$$

Multiplicando em cruz:

$$N \times 10^{-4} = C \times 1$$

$$N = C \times 1/10^{-4} \text{ ou}$$

$$N = C \times 10^4 \text{ células/mL e multiplicar pelo fator de diluição}$$

Assim, pelo exemplo de 95 células contadas e diluição de 1:100

$$N = C \times 10^4 \times \text{diluição}$$

$$N = 95 \times 10^4 \times 100$$

$$N = 9,5 \times 10^7 \text{ células/mL}$$

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 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 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. A seguir 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 = $0,1 \text{ mL}$ 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:

Ex. de contagem na diluição a 10^{-3} , plaqueando-se 0,1 ml

Placa 1: 110 colônias

Placa 2: 130 colônias

Média: 120 colônias

Faz-se um regra de três

120 colônias – 0,1 mL

X colônias – 1 mL

Multiplicando em cruz fica:

$$X \times 0,1 = 120 \times 1$$

$$X = 120 / 0,1$$

$$X = 1200 \text{ colônias}$$

Multiplicando pela diluição, se a diluição foi 10^{-3} , multiplica-se por 10^3 (=1000)

$$1200 \times 10^3 = 12 \times 10^5 \text{ ou } 1,2 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$$

UFC = unidades formadoras de colônias