

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Patógenos em Alimentos

Foto: Cláudio Norões



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos

337 *Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
ISSN 0102-0110*

152 *Embrapa Agroindústria Tropical
ISSN 2179-8184*

116 *Embrapa Agroindústria de Alimentos
ISSN 1516-8247*

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Patógenos em Alimentos

Terezinha Feitosa Machado
Janine Passos Lima da Silva

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Cláudio Norões

1ª edição (*online*)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Machado, Terezinha Feitosa.

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Patógenos em Alimentos. / Terezinha Feitosa Machado e Janine Passos Lima da Silva. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

15 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 337; Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, 152; Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, 116).

1. Recursos Genéticos – Micro-organismos. 2. Conservação. 3. Patógenos em Alimentos. I. Silva, Janine Passos Lima da. II. Título. III. Série.

581.15 - CDD

© Embrapa 2011

Autores

Terezinha Feitosa Machado

Ph.D. em Bioquímica, Pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical

terezinha.feitosa@embrapa.br

Janine Passos Lima da Silva

Ph.D. em Ciências dos Alimentos, Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos

janine@ctaa.embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, essa necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Biodiversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	08
Coleta de amostras	09
Preparo de amostras para o isolamento de bactérias em alimentos	09
Isolamento e caracterização	09
Isolamento e caracterização de <i>Escherichia coli</i> pela técnica do Número Mais Provável (NMP)	09
Isolamento e caracterização de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Isolamento e caracterização de <i>Salmonella</i> spp.	11
Conservação	12
Ultracongelamento	12
Liofilização	13
Referências	14

Patógenos em Alimentos

Terezinha Feitosa Machado
Janine Passos Lima da Silva

Introdução

Os micro-organismos são seres ubíquos. Assim, qualquer alimento, natural ou processado, pode estar ou não contaminado por micro-organismos, cujos tipos encontrados dependem, principalmente, das características físicas e químicas do alimento e poderão levar a consequências que vão desde uma simples alteração do produto até toxinfecções graves no consumidor (SHINOHARA *et al.*, 2008). *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* são os agentes microbianos mais comumente associados aos processos de toxinfecções alimentares, podendo ser isolados de diferentes alimentos que tenham sido indevidamente higienizados e manipulados. O isolamento destes patógenos requer a utilização de meios seletivos específicos e para a manutenção e preservação dos isolados, várias são as técnicas que poderão ser utilizadas.

A compreensão do papel de micro-organismos no meio ambiente fornece subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, de projetos em agricultura sustentável e de programas de desenvolvimento industrial e o que cria oportunidade para esses processos tecnológicos são as coleções de culturas (CANHOS, 1994).

Coleções de culturas de micro-organismos surgiram com o início da Microbiologia e a necessidade de troca de informações e comparação/compartilhamento de resultados entre pesquisadores e laboratórios. Inicialmente, as coleções tinham como interesse principal a taxonomia e a epidemiologia. Com a aplicação de conhecimentos de bioquímica e fisiologia celular, surgiram coleções especializadas, direcionadas aos micro-organismos com potencial tecnológico. Nos últimos 20 anos, com os avanços do conhecimento em genética molecular, as coleções passaram a ser vistas como "pool" de genes, com amplas possibilidades de aplicações e estudos (ALCARDE; BASSO, 1997).

O sucesso da preservação de cepas é muito importante em uma coleção de culturas e exige familiaridade com técnicas modernas, que deverão causar o mínimo dano às células e que assegure a máxima viabilidade e estabilidade do comportamento genotípico. Assim, a escolha do método depende da disponibilidade do laboratório, longevidade da preservação (meses ou anos), estabilidade genética das culturas para manutenção das características morfológicas, metabólicas e de patogenicidade, além dos fatores econômicos (RODRIGUES, LÍRIO; LACAZ, 1992; SAFRONOVA; NOVIKOVA, 1996).

Coleta de amostras

Preparo de amostras para o isolamento de bactérias em alimentos

- A área de trabalho deve estar limpa, com portas e janelas fechadas para evitar corrente de ar.
- Desinfetar toda a superfície de trabalho com etanol 70%.
- Lavar as mãos e desinfetar com um desinfetante adequado ao contato com a pele.
- Trabalhar, preferencialmente, no interior de capelas de fluxo laminar vertical.
- Nunca pipetar com a boca, mas sim com a utilização de pipetadores.
- Depois de utilizados, acomodar pipetas e outros utensílios em bandejas de descarte.
- Todos os instrumentos e utensílios utilizados na abertura de embalagens e para retirada das unidades analíticas devem ser previamente esterilizados ou mergulhados em etanol 70% e flambados no momento do uso.
- Retirar uma mostra do alimento e preparar diluições seriadas em água peptonada 0,1% ou tampão fosfato pH 7,2 (DOWNES; ITO, 2001).

Isolamento e caracterização

Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* pela técnica do Número Mais Provável (NMP)

Teste presuntivo: três alíquotas de três diluições da amostra são inoculadas em série de três tubos de ensaios contendo 10 mL de caldo Lauril sulfato triptose (LST) e tubo de Durham invertido. Incubar a 35 °C/ 24-48 h. Observar o crescimento microbiano com produção de gás, característico de coliformes.

Teste de confirmação: transferir uma alçada de cada tubo de caldo LST positivo para o meio seletivo caldo *E. coli* (EC). Incubar em banho a 45,5 ± 0,2 °C/24 h. Observar o crescimento microbiano com produção de gás, característico de coliformes termotolerantes.

Isolamento e caracterização de *E. coli*: transferir uma alçada de cada tubo positivo de caldo EC para a superfície de placas de Petri contendo ágar Levine Eosina Azul de Metileno (EMB), previamente preparadas e secas. Espalhar o inóculo com alça de Drigalski, até que todo o excesso de líquido seja absorvido. Incubar as placas a 35 °C/24 h. Selecionar colônias típicas (colônias de cor negras com brilho verde metálico) para confirmação por meio das seguintes provas bioquímicas: coloração de Gram (negativo), citrato (negativo), Voges Proskauer-VP (negativo), Vermelho de metila-VM (positivo) e indol (positivo).

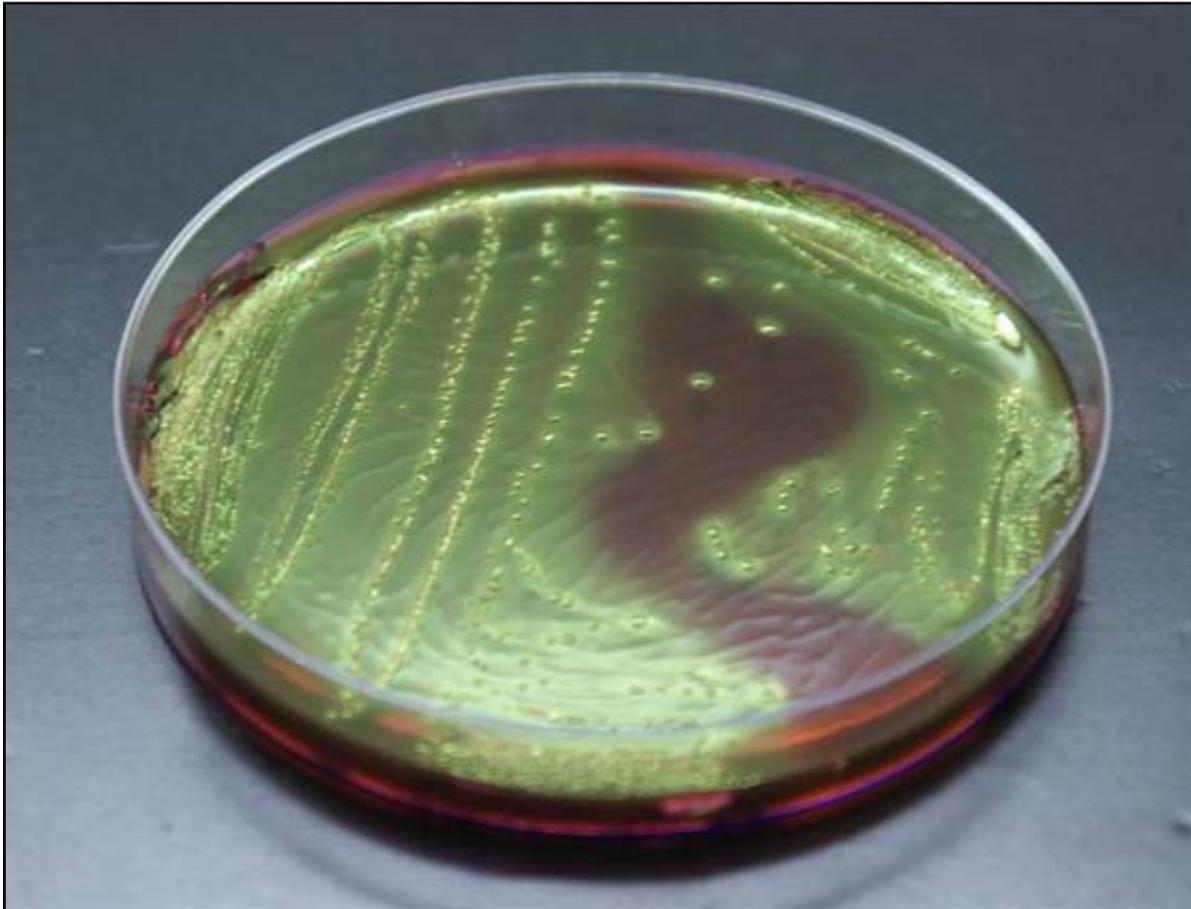


Figura 1: Colônias típicas de *E. coli* em ágar EMB.

Isolamento e caracterização de *Staphylococcus aureus*

- Inocular 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas de ágar Baird Parker, previamente preparadas e secas.
- Espalhar o inóculo com alça de Drigalski, até que todo o excesso de líquido seja absorvido.
- Incubar as placas a 35-37°C por 45-48 h.
- Selecionar colônias típicas (colônias negras com halo transparente) e transferir para tubos de ensaios contendo caldo infusão cérebro e coração (BHI). Incubar a 35-37°C/18-24 h.
- Confirmar as colônias típicas por meio de teste de coagulase, catalase, termonuclease, sensibilidade à lisostafina e utilização anaeróbica da glicose e do manitol (BENNETT; LANCETTTE, 2001).

Foto: Cláudio Norões

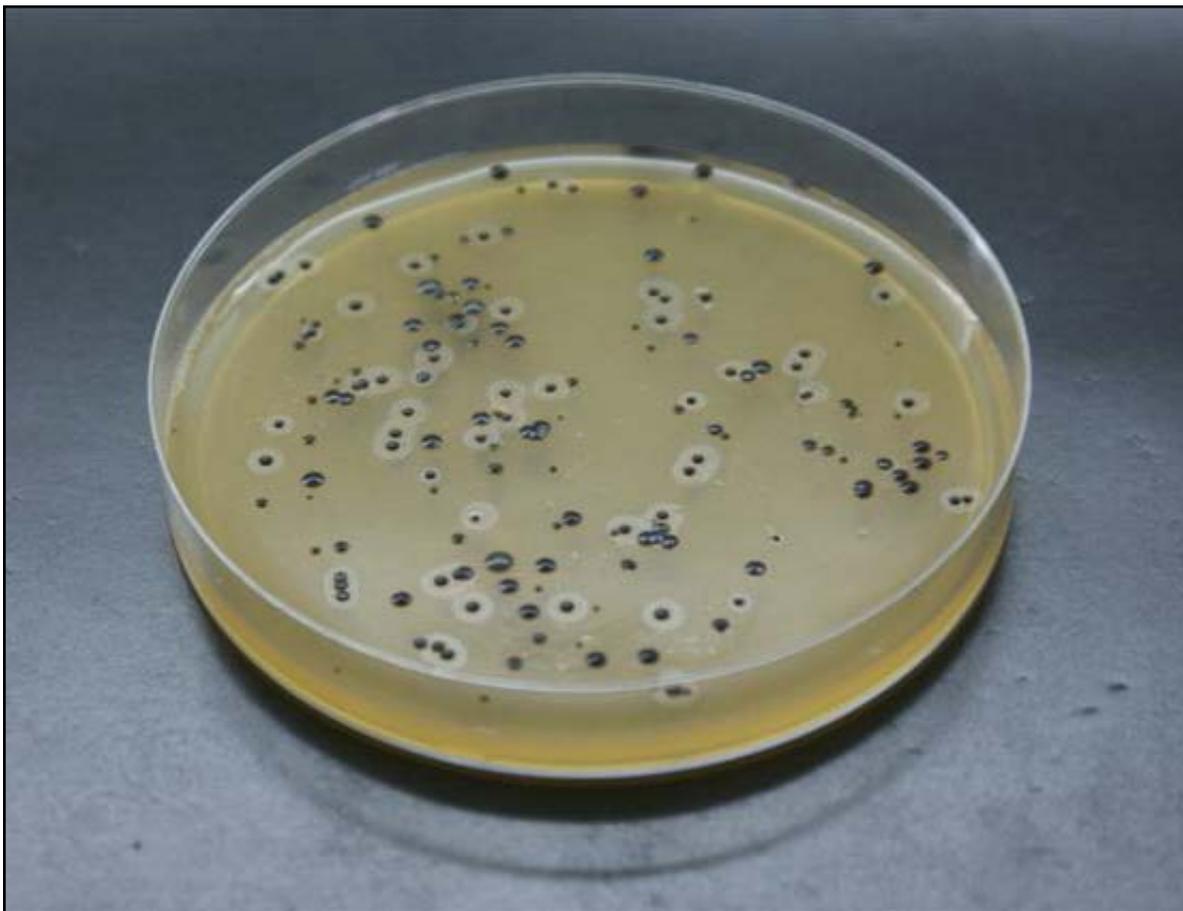


Figura 2 - *Staphylococcus aureus* em ágar Baird Parker.

Isolamento e caracterização de *Salmonella* spp.

- Pré-enriquecer uma alíquota da amostra (25 g) em caldo lactosado (225 mL). Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2$ h.
- Transferir alíquotas da amostra pré-enriquecida (1,0 mL e 0,1 mL) para os caldos de enriquecimento seletivo, tetratonato de sódio (TT) e Rappaport-Vasilidis (RV) modificado, respectivamente. Incubar o caldo TT a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2$ h ou em banho a $43^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2$ h para produtos com alta carga microbiana e o caldo RV a $42^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2$ h.
- Transferir alíquotas de amostras, enriquecidas seletivamente e fazer plaqueamento seletivo diferencial nos meios de cultivo ágar Entérico de Hectoen, ágar bismuto sulfito e ágar xilose lisina desoxicolato. Incubar as placas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2$ h.
- Selecionar colônias típicas e estriar em tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) inclinados. Incubar os tubos a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/24 \pm 2$ h.
- Confirmar as culturas típicas a partir do crescimento em ágar TSI por provas sorológicas e bioquímicas. Para os testes bioquímicos podem ser utilizados “kits” de identificação validados pela AOAC para *Enterobacteriaceae*: API 20E (BioMeriéux Vitek), Vitek GNI (BioMeriéux Vitek), Enterotube II (Becton Dicson), *Enterobacteriaceae* (Becton Dicson) e

Micro ID (Remel). Uma alternativa a esses “kits” é a realização das seguintes provas bioquímicas: urease, descarboxilação da lisina, fermentação do dulcitol, lactose e sacarose, teste de indol, citrato, vermelho de metila e Voges-Proskauer, crescimento em caldo cianeto de potássio, teste de malonato, detecção dos antígenos flagelares (poli H) e antígenos somáticos (poli O) (ANDREWS; HAMMACK, 2006).



Foto: Cláudio Norões

Figura 3. *Salmonella* em agar xilose lisina desoxicolato – XLD.

Conservação

Ultracongelamento

O método baseia-se no princípio de indução da dormência do micro-organismo e consiste em:

- transferir de duas a cinco colônias da cultura pura da bactéria para 2 mL do caldo infusão cérebro coração (caldo BHI). Incubar a 35-37°C/24 h;
- transferir uma alíquota de 500 µL da cultura recém-crescida para criotubos estéreis;
- adicionar 500 µL de glicerol 10%, previamente esterilizado;
- resfriar a suspensão bacteriana a 4°C por 30 minutos;
- transferir para um freezer a -20°C por 20 minutos;
- armazenar em *ultrafreezer* a -86°C; e
- reativação: descongelar sob refrigeração a 4°C. Fazer diluições decimais do agente crioprotetor. Plaquear na superfície de meio não seletivo. Incubar a 35-37°C/24 h. Plaquear em meio seletivo. Incubar a 35-37°C/24 h. Verificar a viabilidade após um mês, e depois a cada ano.

Liofilização

No processo da liofilização, as células são desidratadas a baixa temperatura sob vácuo, reduzindo ao mínimo seu metabolismo, mantendo sua efetiva viabilidade e estabilidade genética a longo prazo. Para esse procedimento de conservação, seguir a metodologia recomendada no manual de bactérias ácido-láticas.

Referências

- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 3, 1997.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. (2006). *Samonella*. In: Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual online**. <http://www.cfsan.fda.gov>. Accessed 12 October 2010. Chapter 5, updated June 2006.
- BENNETT, R. W., LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual online**. <http://www.cfsan.fda.gov>. Accessed 30 September 2010. Chapter 12, revised January 2001.
- CANHOS, V. P. Views of a developing country. In: KIRSOP, B. & HAWKSWORTH, D. L. (Ed.). **The biodiversity of microorganisms and the role of microbial resource centers**. World Federation for Culture Collections, p. 45-52, 1994.
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. (1991). Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, 22, 206-208.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examinations of foods**, 4th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association - APHA, 2001.
- RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. (1992). Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 34, 159-165.
- SAFRONOVA, V. I.; NOVIKOVA, N. I. (1996). Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen freezing, **Journal of Microbiological Methods**, 2, 231-237.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. (2008). *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13, 1675-1683.
- SILVA, L. F.; KAMIYA, N. F.; OLIVEIRA, M. S.; ALTERTHUM, F. (1992). Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. **Revista de Microbiologia**, 23, 177-182.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*