



# **Sobrevivência de *Staphylococcus* coagulase-positiva em diferentes condições de temperatura, NaCl e pH**

Alexandra Isabel Adolfo Pereira

Orientadores:

Doutora Maria Cristina Canavarro  
Doutora Cristina Maria Santos Pintado

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciada em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Santos Pintado e da Doutora Maria Cristina Canavarro Teixeira, Professores Adjuntos da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

novembro 2013



## Agradecimentos

Começo por agradecer à minha mãe e irmãs por todo o carinho, apoio, ajuda e incentivo, pois sem vocês nada disto seria possível.

A todo o pessoal do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária, por se terem mostrado sempre disponíveis para ajudar, pela simpatia e conhecimentos transmitidos.

À Dr.<sup>a</sup> Cristina Maria Santos Pintado e à Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Canavarro Teixeira, que me orientaram, pela ajuda, acompanhamento e disponibilidade que me prestaram sempre.

A todos que de certa forma me acompanharam e contribuíram para que chegasse ao fim desta etapa.

**Muito Obrigada!**



## Resumo

O presente trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, visa estudar a sobrevivência de oito culturas de *Staphylococcus* perante diferentes condições de temperatura, pH e NaCl durante um período de incubação de 20 dias. Para este efeito foi utilizado a contagem em placa de Petri e posteriormente o método da microplaca com leitura de absorvância em espectrofotómetro.

As referidas culturas foram isoladas de leite e queijos da Beira Baixa, em diferentes fases de maturação.

Com os resultados obtidos nas contagens em placa de Petri, pode verificar-se que, no geral, o microrganismo multiplicou-se mais favoravelmente a temperaturas de 22°C, atingindo valores na ordem de  $10^{10}$  UFC/ml.

Relativamente aos ensaios feitos em microplaca, podemos afirmar que para pH mais elevado, entre 6 e 7, todas as culturas estudadas multiplicaram-se de forma significativa nas diferentes temperaturas de incubação de 12°C, 18°C e 30°C. No entanto, apenas a pH mais baixos se verificou multiplicação a 30°C. Em relação ao fator NaCl, quanto mais elevada for a sua concentração, maior é a sua inibição provocada sobre o desenvolvimento de *Staphylococcus*.

O modelo de regressão logística revelou ser significativo para combinação dos fatores pH e NaCl que permitiram a multiplicação das culturas ATCC e 106 de *Staphylococcus* a pH de 6 e 7, com uma diminuição gradual à medida que aumenta os valores de NaCl aplicados. Já para pH de 4 e 5 a multiplicação das culturas foi nula independentemente da percentagem de NaCl.

## Palavras chave

*Staphylococcus* coagulase-positiva, pH, temperatura, NaCl, segurança alimentar



## Abstract

This work performed at the Laboratory of Microbiology, Escola Superior Agrária of Castelo Branco , aims to study the survival of eight cultures of *Staphylococcus* face different conditions of temperature , pH and NaCl during an incubation period of 20 days. For this purpose we used the plate count and subsequently the method of the microplate spectrophotometer absorbance reading .

These cultures were isolated from milk and cheese from Beira Baixa , in different stages of maturation.

With the results in the plate counts, it can be seen that , in general, the organism multiplied more favorably at temperatures of 22°C , reaching values in the order of  $10^{10}$  CFU / ml .

For tests performed in microplates, we can say that for higher pH between 6 and 7, all cultures studied multiplied significantly in the different incubation temperatures of 12°C, 18°C and 30°C. However, only low pH multiplication occurred at 30°C. Regarding factor NaCl , the higher the concentration , the greater is its caused on the development inhibition of *Staphylococcus* .

The logistic regression model was shown to be significant factors for the combination of pH and NaCl which allowed the multiplication of cultures of *Staphylococcus aureus* ATCC and 106, at pH 6 and 7, with a gradual decrease as increasing values of NaCl applied . As to pH 4 and 5 multiplication of cultures was null independently of the percentage of NaCl.

## Keywords

*Staphylococcus aureus*, pH, temperature, NaCl, food safety



# Índice geral

<b>Resumo</b> .....	iii
<b>I. Introdução</b> .....	1
<b>II. Revisão Bibliográfica</b> .....	2
1. <i>Staphylococcus aureus</i> e outros <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.....	2
2. Classificação e métodos de tipagem.....	2
3. Aspectos ecológicos do <i>Staphylococcus</i> no Homem.....	3
4. Fatores de virulência – Toxinas.....	3
5. Incidência nos alimentos e ambiente.....	4
<b>6. Fatores ambientais que afetam a sobrevivência.</b> .....	5
6.1. Temperatura .....	5
6.2. pH .....	5
6.3. NaCl .....	6
<b>7. Fatores que influenciam a multiplicação de <i>Staphylococcus aureus</i> durante a maturação no queijo.</b> .....	6
7.1. Temperatura .....	7
7.2. pH .....	7
7.3. NaCl .....	7
<b>8. Influência do ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico.</b> .....	7
<b>III. Material e Métodos</b> .....	8
1. Preparação dos meios de cultura .....	8
<b>2. Culturas usadas nos ensaios</b> .....	9
2.1. Origem das culturas .....	9
2.2. Confirmação da coagulase em meio Baird-Parker com RPF Agár .....	9
2.3. Teste Prolex™ Staph Látex Kit .....	10
3. Preparação do inóculo em meio BHI.....	10
4. Avaliação do efeito combinado da temperatura, pH e NaCl numa cultura de <i>Staphylococcus</i> ref <sup>a</sup> 106, usando o método da contagem em placa.....	12
5. Avaliação do efeito combinado entre diferentes concentrações de NaCl, pH e diferentes temperaturas sobre culturas de <i>Staphylococcus</i> .....	13
6. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de NaCl e de diferentes valores de pH sobre duas culturas de <i>Staphylococcus</i> .....	15
7. Leitura visual da turvação e em espectrofotômetro .....	16
8. Confirmação de poços negativos .....	16
9. Análise estatística.....	18
<b>IV. Resultados e Discussão</b> .....	17

1. Coloração de gram.....	18
2. Confirmação da coagulase .....	18
<b>3. Avaliação do efeito combinado da Temperatura, pH e NaCl numa cultura de <i>Staphylococcus</i> ref<sup>a</sup> 106, usando o método da contagem em placa .....</b>	<b>18</b>
3.1. Contagem a 4°C.....	18
3.2. Contagem a 12°C .....	19
3.3. Contagem a 22°C .....	20
<b>4. Avaliação do efeito combinado entre diferentes concentrações de NaCl, pH e diferentes temperaturas sobre culturas de <i>Staphylococcus</i> .....</b>	<b>22</b>
4.1. Leitura às 48h a 30°C.....	22
4.2. Leitura aos 5 dias a 30°C.....	23
4.3. Leitura aos 7 dias a 30°C.....	24
4.4. Leitura aos 5 dias a 12°C.....	25
4.5. Leitura aos 7 dias a 12°C.....	26
4.6. Leitura aos 15 dias a 12°C.....	26
4.7. Leitura aos 6 dias a 18°C.....	27
4.8. Leitura aos 7 dias a 18°C.....	28
<b>5. Regressão Logística - Avaliação do efeito de diferentes concentrações de NaCl e de diferentes valores de pH sobre duas culturas de <i>Staphylococcus</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>V. Conclusão .....</b>	<b>31</b>
<b>IV. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>34</b>
<b>Apêndices</b>	

## Índice de figuras

<b>Figura 1-</b> Culturas de <i>Staphylococcus aureus</i> inoculadas em meio de cultura Baird-Parker Agar com RPF .....	10
<b>Figura 2-</b> Esquema da preparação e confirmação do inóculo para a cultura 106 .....	11
<b>Figura 3-</b> Preparação das diluições e inoculação em placa .....	13
<b>Figura 4-</b> Contagem do inóculo das culturas de <i>Staphylococcus</i> .....	14
<b>Figura 5-</b> Microplaca com diferentes valores de NaCl incubada a temperaturas de 12°C, 18°C e 30°C.....	14
<b>Figura 6-</b> Microplaca com diferentes concentrações de pH incubada a temperaturas de 12°C, 18°C e 30°C.....	14
<b>Figura 7-</b> Microplaca da cultura 106 e de referência com diferentes valores de pH e concentrações de NaCl incubada a temperaturas de 18°C .....	15
<b>Figura 8-</b> Duplicado e triplicado da microplaca da cultura 106 e de referência incubada a temperaturas de 18°C .....	16
<b>Figura 9-</b> Microplaca da cultura 106 com concentração de NaCl a 0,5% a pH=7 .....	16
<b>Figura 10-</b> <i>Staphylococcus</i> com coloração de gram .....	17
<b>Figura 11-</b> Identificação de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva em meio Baird-Parker com RPF Agár.....	18
<b>Figura 12-</b> Identificação de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva pelo Teste Prolex™ Staph Látex Kit.....	18
<b>Figura 13-</b> Contagem de <i>Staphylococcus</i> a 4°C e a diferentes condições de pH (5,4; 6; 6,6) e de NaCl (0,19%; 2%; 4%) .....	19
<b>Figura 14-</b> Contagem de <i>Staphylococcus</i> a 12°C e a diferentes condições de pH (5,4; 6; 6,6) e de NaCl (0,19%; 2%; 4%) .....	20
<b>Figura 15-</b> Contagem de <i>Staphylococcus</i> a 22°C e a diferentes condições de pH (5,4; 6; 6,6) e de NaCl (0,19%; 2%; 4%) .....	21
<b>Figura 16-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva com diferentes concentrações de NaCl às 48H a 30°C .....	22
<b>Figura 17-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva em diferentes níveis de pH às 48H a 30°C.....	23
<b>Figura 18-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva com diferentes concentrações de NaCl aos 5 dias a 30°C .....	24
<b>Figura 19-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva com diferentes níveis de pH aos 5 dias a 30°C .....	24
<b>Figura 20-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva com diferentes concentrações de NaCl aos 7 dias a 30°C .....	24
<b>Figura 21-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus coagulase-</i> positiva com diferentes níveis de pH aos 7 dias a 30°C .....	25

<b>Figura 22-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes concentrações de NaCl aos 5 dias a 12°C .....	15
<b>Figura 23-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes níveis de pH aos 5 dias a 12°C .....	26
<b>Figura 24-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes concentrações de NaCl aos 7 dias a 12°C .....	26
<b>Figura 25-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes níveis de pH aos 7 dias a 12°C .....	26
<b>Figura 26-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes concentrações de NaCl aos 15 dias a 12°C.....	27
<b>Figura 27-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes níveis de pH aos 15 dias a 12°C .....	27
<b>Figura 28-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes concentrações de NaCl aos 6 dias a 18°C .....	28
<b>Figura 29-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes níveis de pH aos 6 dias a 18°C .....	28
<b>Figura 30-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes concentrações de NaCl aos 7 dias a 18°C .....	20
<b>Figura 31-</b> Leitura da absorvância em microplaca de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva com diferentes níveis de pH aos 7 dias a 18°C .....	29
<b>Figura 32-</b> Multiplicação da cultura de referência de <i>Staphylococcus</i> em função do pH e NaCl.....	29
<b>Figura 33-</b> Multiplicação da cultura 106 de <i>Staphylococcus</i> em função do pH e NaCl.....	30

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1-</b> Caracterização de culturas de <i>Staphylococcus</i> usadas .....	9
<b>Tabela 2-</b> Valores de temperatura, NaCl e pH para contagem em placa de <i>Staphylococcus</i> .....	12