



# Execução de ensaios microbiológicos nas áreas alimentar, ambiental e técnica em contexto empresarial

Maria Celeste Alves Cunha

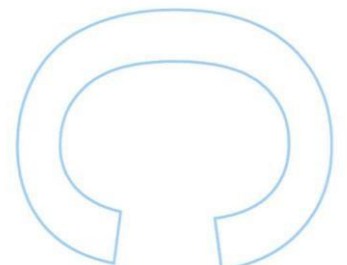
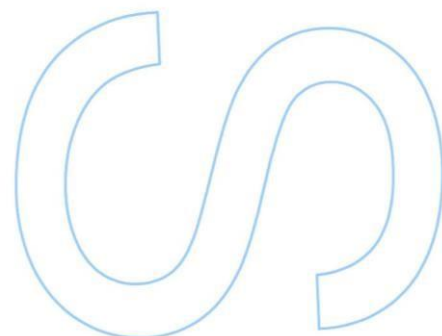
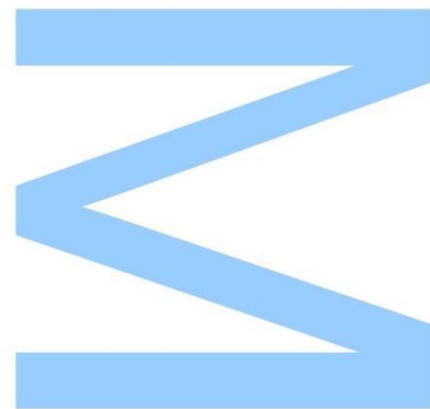
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar  
Departamento de Química e Bioquímica  
2017

## **Orientador**

José Américo Pereira de Sousa, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## **Coorientador**

Sílvia Silva, Diretora técnica da MicroChem – Ensaios e Análises Técnicas, Lda.





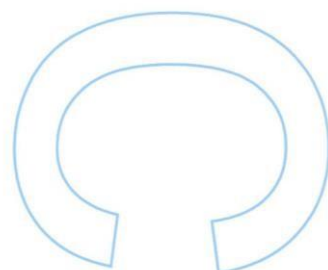
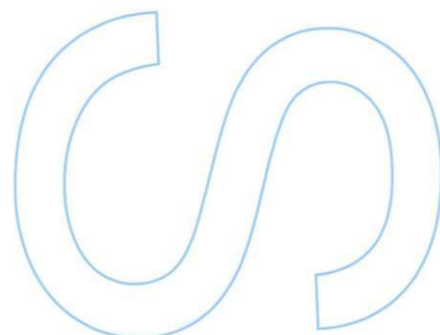
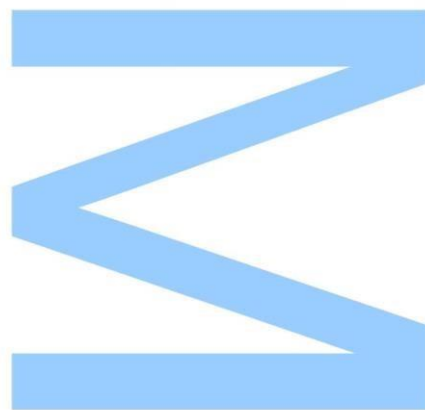
**Universidade do Minho**



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



*“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no  
dicionário.”*

**Albert Einstein**



# Agradecimentos

Este ano ficará para sempre gravado na minha memória. Foi um ano de muito trabalho, muitas mudanças e cansaço, mas acima de tudo, foi um ano desafiante e enriquecedor. Foram algumas, as vezes que achei que não seria capaz de atingir os meus objetivos, mas felizmente consegui e, neste momento, não poderia estar mais orgulhosa de mim. Com força de vontade e dedicação, não tenho dúvidas, que tudo é possível.

Todo este trabalho não teria sido possível sem algumas pessoas, às quais dou o meu sincero agradecimento.

À MicroChem por me ter dado a oportunidade de estagiar nas suas instalações, onde foi possível realizar este trabalho, permitindo-me colocar em prática os meus conhecimentos, e desenvolver as minhas capacidades práticas e críticas.

Às minhas colegas do laboratório de microbiologia, Rita e Sofia, por me terem recebido tão bem, tendo sido essenciais neste meu percurso. Obrigada por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e ajuda, e pela amizade criada.

À minha orientadora Engenheira Sílvia, por todas as oportunidades dadas, pela compreensão e disponibilidade em ajudar-me.

Ao meu orientador, o Professor José Américo de Sousa, que não me conhecendo, nem sendo a sua área, aceitou este projeto, mostrando-se sempre disponível. Obrigada por toda a ajuda e conselhos.

Aos meus pais, que apesar de tudo, fizeram de mim a pessoa dedicada e lutadora que sou. Obrigada, por apesar de todas as dificuldades, deixaram-me lutar pelos meus sonhos e objetivos.

Ao meu maninho Francisco, que apesar das nossas desavenças é um ótimo irmão, e sei que posso contar com ele.

Ao Pedro Teixeira, o meu namorado, o meu melhor amigo e o meu pilar. Obrigada por todo o amor, carinho e apoio. Por ouvir as minhas frustrações e os meus medos, por amparar as minhas lágrimas e me motivar. Porque sempre que precisei, estava lá para me lembrar que sou capaz de tudo.

Ao Leandro Santos e à Joana Anjos, os melhores amigos, que a faculdade me deu. Obrigada por me acompanharem durante todo este percurso académico, pelas conversas e desabafos, por todo o apoio e ajuda. Sei que posso contar sempre

convosco. Obrigada por todos os momentos fantásticos e divertidos, essenciais para desanuviarmos.

Ao Tiago Azevedo e à Diana Silva, meus amigos e companheiros de mestrado, por todo o apoio e ajuda. Pelos desabafos e pela amizade, e por todos os momentos bem passados.

Ao Pedro Leitão, ao Artur Silva, à Joana Gaspar e à Cátia Sequeira que apesar de nem sempre conseguirem estar presentes, sei que posso sempre contar convosco. Obrigada por tudo, por me acompanharem neste percurso e pelos bons momentos de divertimento. Mais que uma amizade, são como uma família.

Um muito obrigado a todos!

## Resumo

Os alimentos e a água são um reservatório de microrganismos, podendo facilmente serem contaminados com microrganismos patogénicos, isto é, capazes de nos provocar uma intoxicação ou infeção alimentar, e em alguns casos, doenças mais graves.

Nos dias de hoje, grande parte dos alimentos são processados e fabricados industrialmente, e a troca de alimentos a nível global é cada vez maior, aumentando as probabilidades de contaminação, se não forem tomadas as medidas adequadas. De forma a proteger a saúde dos consumidores, existe alguma legislação que obriga as empresas a implementar medidas que garantam a segurança e a qualidade dos seus produtos. A realização de análises microbiológicas a alimentos, águas, superfícies e manipuladores, são essenciais para verificar a eficácia das boas práticas de higiene e das boas práticas de fabrico, e para garantirem que os seus produtos são seguros.

O homem, cada vez mais, utiliza a água para fins recreativos e de lazer, havendo um maior risco de contaminação. O controlo microbiológico destas águas é essencial, garantindo segurança aos seus utilizadores.

A maioria das empresas, não tem capacidade para fazer este controlo de qualidade, pelo que, contratam laboratórios acreditados para efetuarem as análises necessárias.

No âmbito do Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar foi realizado um estágio no laboratório de microbiologia, na empresa MicroChem, - Ensaios e Análises Técnicas, Lda. O estágio teve como objetivo a integração do estagiário em ambiente laboratorial e empresarial. O estagiário teve como principais funções a preparação de meios de cultura e o respetivo controlo de qualidade, a análise microbiológica a diferentes tipos de águas, alimentos, superfícies e manipuladores. Ao estagiário foi dada a oportunidade de participar na implementação do método NMP para análise microbiológica de águas balneares, e iniciar um trabalho relativo à validação de um novo meio de cultura, por comparação deste com o meio indicado na norma de referência, para a deteção e enumeração de espécies de *Legionella*, nas águas.

Com a realização do presente estágio foi possível aplicar conhecimentos adquiridos durante o mestrado e, complementarmente, na licenciatura de biologia, permitindo um desenvolvimento de capacidades práticas e técnicas, na área das análises microbiológicas alimentares e ambientais.

Palavras – chave: Análises Microbiológicas, Controlo de Qualidade, Ensaios Laboratoriais, Microrganismos, Segurança Alimentar

## Abstract

Food and water are a reservoir of microorganisms, that can be easily contaminated with pathogenic microorganisms, this is, capable to cause food poisoning, intoxication or in other cases severe diseases.

Nowadays, food is mainly processed and manufactured industrially, and global food trade is increasing, increasing the likelihood contamination if appropriate measures are not applied. To protect the health of consumers, there is some legislation that obligates companies to implement measures that can guaranty the security and quality of their products. The microbiological analyses to food, water, surfaces and manipulators are essential for verifying the efficiency of the good hygiene and manufacturing practices, so that they can guarantee their products are safe.

Man, more and more, uses water for recreational and leisure purposes, and there is a greater risk of contamination. The microbiological control of these waters is essential, guaranteeing safety to its users.

Most companies, don't have the ability to execute this kind of quality control, consequently they hire certified labs to make all the necessary tests and analyses.

In the scope of the master's degree of Technology and Food Science an internship was fulfilled in a microbiology lab at the company MicroChem – Ensaios e Análises Técnicas Lda. The internship had the goal of integrating the intern in a lab and corporate environment. The intern had as primary functions the preparations of the culture mediums and the respective analyses of quality control, microbiological analyses of different kinds of water, food, surfaces and manipulators. To the intern it was given the opportunity of participating in the implementation of the NMP method for microbiological analyses of bathing waters, and began a work linked to the validation of a new culture medium, by comparing with the medium indicated in the reference norm, for detecting and enumerate the different species of *Legionella*, in the waters.

With the conclusion of the present internship, it was possible to apply knowledge acquired during the masters course and, complementary, to the biology graduation, allowing a development of technical and practical skills, in the area of food and environmental microbiological analyses.

Keywords: Quality control, Lab Trials, Microbiological Analyses, Microorganisms, Food safety



# Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice Geral .....	v
Índice de Figuras .....	ix
Índice de tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas .....	xii
I. Introdução.....	1
Organização do relatório de estágio.....	2
Objetivos do Trabalho.....	2
A empresa .....	3
II. Revisões Bibliográficas.....	4
Importância da Água .....	5
Conceito de qualidade da água.....	6
Quadro Legal Aplicado à Qualidade da água .....	7
Água destinada ao consumo humano.....	7
Piscinas.....	9
<i>Legionella sp.</i> .....	11
Águas minerais naturais .....	11
Águas balneares.....	12
Microbiologia dos Alimentos .....	14
Contaminação biológica dos alimentos .....	14
Fatores determinantes no desenvolvimento dos microrganismos .....	15
Doenças de origem alimentar (DOA) .....	18
Segurança Alimentar .....	18
Critérios Microbiológicos .....	20
Legislação aplicável a critérios microbiológicos .....	21
Valores Guia.....	21
Análises Microbiológicas .....	24
Microorganismos Indicadores.....	24
Parâmetros Microbiológicos.....	25
1. Microrganismos totais/ deterioradores.....	25
1.1. Microrganismos heterotróficos.....	25
1.2. Bolores e leveduras.....	26

2. Microrganismos Indicadores de Contaminação .....	27
2.1. Família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	27
2.1.1. Coliformes.....	27
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	28
2.2. Enterococos intestinais .....	29
2.3. Bactérias Sulfito-redutoras e Esporos de Anaeróbios sulfito-redutores .....	29
2.4. <i>Clostridium perfringens</i> .....	30
3. Microrganismos Patogénicos .....	30
3.1. <i>Salmonella sp.</i> .....	30
3.2. <i>Staphylococcus</i> .....	31
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
3.4. <i>Legionella sp.</i> .....	33
3.5. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
3.6. <i>Bacillus cereus</i> .....	33
III. Parte Experimental.....	35
Preparação e Controlo de Qualidade dos Meios de Cultura (ISO 11133:2014) .....	36
1. Preparação .....	36
2. Controlo de Qualidade.....	38
Análises Microbiológicas .....	39
Métodos de Análise.....	39
1. Método da diluição em placa.....	39
2. Método de Filtração por Membrana .....	40
Análises Microbiológicas às águas.....	40
1. Enumeração de Microrganismos a 22°C e a 36°C (ISO 6222:1999) .....	41
1.1. Procedimento .....	41
2. Detecção e enumeração de <i>Escherichia coli</i> e bactérias coliformes (ISO 9308-1:2014).....	41
2.1. Procedimento .....	42
2.1.1. Teste de Oxidase.....	43
3. Enumeração e deteção de Enterococos intestinais (ISO 7899-2:2000).....	44
3.1. Procedimento .....	44
4. Detecção e enumeração de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ISO 16266: 2006) .....	45
4.1. Procedimento .....	46
4.1.1. Teste de Produção de amónia em meio acetamida .....	47
4.1.2. Teste de Fluorescência em meio King B.....	47

5. Detecção e enumeração de <i>Staphylococcus sp.</i> (Método Interno – NP 4343:1998).....	47
5.1. Procedimento .....	47
5.1.1. Coloração de Gram .....	48
5.1.2. Teste de Catalase .....	49
5.1.3. Tipo Respiratório em MEVAG .....	50
5.1.4. Teste de Coagulase .....	51
6. Detecção e enumeração de <i>Clostridium perfringens</i> (EPA 600) .....	52
6.1. Procedimento .....	52
6.1.1. Incubação em anaerobiose.....	53
6.1.2. Teste do Hidróxido de Amónio .....	53
7. Detecção e enumeração de esporos de Anaeróbios Sulfito – redutores (ISO 6461-2:1986) .....	54
7.1. Procedimento .....	54
8. Detecção de espécies de <i>Salmonella</i> (ISO 19250) .....	54
8.1. Procedimento .....	54
8.1.1. Galeria de Identificação de Bactérias.....	56
8.1.2. Identificação de <i>Salmonella</i> – Latex teste .....	57
9. Detecção e enumeração de espécies de <i>Legionella sp.</i> (ISO 11731 – 2: 2004) .	58
9.1. Procedimento .....	58
9.1.1. Latex teste – Identificação de <i>Legionella</i> .....	59
Cálculos e Expressão de Resultados.....	59
Análises Microbiológicas aos Alimentos .....	60
1. Preparação da Amostra.....	60
1.1. Preparação da Solução-Mãe .....	60
1.2. Preparação das diluições decimais .....	60
2. Enumeração de Microrganismos a 30°C (ISO 4833:2003).....	61
2.1. Procedimento .....	61
3. Enumeração de bactérias coliformes a 30°C (ISO 4832:2006) .....	61
3.1. Procedimento .....	62
4. Enumeração de <i>Escherichia coli</i> (ISO 16649-2:2001).....	63
4.1. Procedimento .....	63
5. Enumeração de <i>Enterobacteriaceae</i> (ISO 21528-2:2004).....	64
5.1. Procedimento .....	64
5.1.1. Teste da fermentação da glucose .....	65
6. Enumeração de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (ISO 6888-1:1999).....	65

6.1. Procedimento .....	66
7. Enumeração de bactérias sulfito – redutoras (ISO 15213:2003).....	67
7.1. Procedimento .....	67
8. Enumeração de <i>Clostridium perfringens</i> (ISO 7937:2004).....	68
8.1. Procedimento .....	68
8.1.1. Teste da Fermentação da Lactose .....	68
8.1.2. Teste nitrato – mobilidade.....	68
9. Enumeração de Bolores e Leveduras (ISO 21527-1: 2008) .....	69
9.1. Procedimento .....	69
10. Enumeração de <i>Bacillus cereus</i> (ISO 7932:2004) .....	69
10.1. Procedimento .....	70
10.1.1. Teste da hemólise.....	70
11. Enumeração de <i>Listeria sp</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO 11290-2/Amd.1:2004).....	71
11.1. Procedimento .....	71
11.1.1. Teste da fermentação dos carboidratos .....	72
11.1.2. Teste de CAMP .....	73
12. Pesquisa de <i>Salmonella</i> (ISO 6579:2002).....	73
12.1. Preparação da solução - mãe .....	74
12.2. Procedimento .....	74
Análises Microbiológicas a Manipuladores e Superfícies (ISO 18593:2004) .....	75
Cálculos e expressão dos resultados para alimentos e zaragatoas .....	75
Controlo de Qualidade dos ensaios .....	77
Ensaio Interlaboratoriais.....	78
Implementação do método NMP para as águas balneares.....	79
1. Procedimento.....	80
1.1. Preparação da solução especial .....	80
1.2. Preparação das diluições .....	80
1.3. Inóculo .....	80
1.4. Leitura.....	80
1.5. Cálculos e expressão dos resultados.....	81
Validação de um meio de cultura para deteção e enumeração de <i>Legionella sp.</i> nas águas.....	81
IV. Conclusão.....	86
Considerações finais.....	87
V. Referências Bibliográficas.....	89

## Índice de Figuras

Figura 1 - Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimento cozinhados prontos a comer (Fonte: Santos et al, 2005). .....	22
Figura 2 – Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura CCA (Fonte: Languet et al., 2013). .....	42
Figura 3- Aspeto típico de colónias de <i>E. coli</i> no meio de cultura CCA (Fonte: Languet et al., 2013).....	42
Figura 4 - Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura CCA (Fonte: Languet et al., 2013). .....	43
Figura 5 - Exemplo de um teste de oxidase (Fonte: Autor). .....	44
Figura 6 - Aspeto típico de colónias suspeitas de Enterococos Intestinais no meio de cultura SB (Fonte: Autor). .....	45
Figura 7 – Aspeto típico de colónias de enterococos intestinais no meio de cultura BEA (Fonte: Autor).....	45
Figura 8 – Aspeto típico de colónias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no meio de cultura CN (Fonte: <a href="http://pvl.pt">http: pvl.pt</a> ).....	46
Figura 9 – Aspeto típico de colónias suspeitas de <i>Staphylococcus sp.</i> no meio de cultura MSA (Fonte: Autor).....	48
Figura 10 - Exemplo de resultados positivos no teste da catalase (Fonte: Autor). .....	50
Figura 11 – Tipo respiratório em MEVAG, exemplos de resultados positivos (tubos 405, 5 e 6) e negativos (os restantes) (Fonte: Autor). .....	51
Figura 12 – Observação de um resultado positivo para o teste da coagulase (Fonte: Autor).....	52
Figura 13 - Observação de um resultado negativo para o teste da coagulase (Fonte: Autor).....	52
Figura 14 - Exemplo de um kit de anaerobiose (Fonte: <a href="https://www.merckmillipore.com">https://www.merckmillipore.com</a> ). .....	53
Figura 15 - Possíveis resultados observáveis nos tubos com meio de cultura TSI (Fonte: Autor).....	55

Figura 16 - Possíveis resultados observáveis nos tubos com meio de cultura TSI (Fonte: Autor).....	55
Figura 17 – Exemplo da galeria de identificação utilizada para a identificação de <i>Salmonella sp.</i> (Fonte: Autor) .....	57
Figura 18 – Exemplo do papel com o resultado das reações observáveis na galeria de identificação (Fonte: Autor).....	57
Figura 19- Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura VRBL (Fonte: Autor).....	62
Figura 20- Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura VRBL (Fonte: Autor).....	62
Figura 21- Aspeto típico de colónias de <i>Escherichia coli</i> no meio de cultura TBX (Fonte: Autor).....	63
Figura 22 - Aspeto típico de colónias de <i>Escherichia coli</i> no meio de cultura TBX (Fonte: Autor).....	63
Figura 23 - Aspeto típico de colónias de <i>Enterobacteriaceae</i> no meio de cultura VRBG (Fonte: Autor),.....	64
Figura 24- Aspeto típico de colónias de <i>Enterobacteriaceae</i> no meio de cultura VRBG (Fonte: Autor) .....	64
Figura 25 - Exemplo de resultados positivos para a fermentação da glucose (tubos amarelos) e de resultado negativo não fermentação da glucose (tubo roxo) (Fonte:Autor). .....	65
Figura 26 – Aspeto típico de colónias suspeitas de estafilococos coagulase-positiva no meio de cultura BP. ....	66
Figura 27- Aspeto típico de colónias suspeitas de estafilococos coagulase-positiva no meio de cultura BP. ....	66
Figura 28 – Aspeto típico de colónias de bactérias sulfito-redutoras no meio de cultura TSC (Fonte: Autor) .....	67
Figura 29 - Aspeto típico de colónias de bactérias sulfito-redutoras no meio de cultura TSC (Fonte: Autor).....	67
Figura 30 - Aspeto típico de colónias suspeitas de <i>Bacillus cereus</i> no meio de cultura MYP (Fonte: Autor).....	70

Figura 31- Exemplo de um resultado positivo no teste da hemólise em meio de cultura Columbia 5%. .....	71
Figura 32- Aspeto típico de colónias suspeitas de <i>Listeria sp.</i> no meio de cultura OCLA (Fonte: Autor) .....	72
Figura 33 - Exemplo dos possíveis resultados no teste da Rhamnose (Fonte: Autor). 73	
Figura 34 - Exemplo de resultados negativos no teste da Xilose (Fonte: Autor).....	73
Figura 35 - Microplaca contendo meio de cultura MUD (Fonte: Autor). .....	81
Figura 36 - Microplaca contendo meio de cultura MUG (Fonte: Autor).....	81
Figura 37 - Observação de fluorescência azul sob luz UV (Fonte: Autor) .....	81
Figura 38 - Aspeto típico de colónias suspeitas de <i>Legionella sp.</i> no meio de cultura GVPC .....	84
Figura 39 - Aspeto típico de colónias de <i>Legionella sp.</i> no meio de cultura cromogénico. ....	84
Figura 40 - Observação de fluorescência vermelha das colónias no meio de cultura cromogénico. ....	84

## Índice de tabelas

Tabela 1- Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para a água fornecida por redes de distribuição, fontanários, camiões ou navios-cisterna, reservatórios e água utilizada na indústria alimentar (Decreto-Lei n.º 306/2007, anexo I, parte I).....	8
Tabela 2 - Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para a água colocada à venda em garrafas ou outros recipientes (Decreto-Lei n.º 306/2007, anexo I, parte I). 8	
Tabela 3 - Parâmetros microbiológicos a analisar nos controlos de rotina (Decreto-Lei n.º 306/2007, anexo II).....	9
Tabela 4 - Parâmetros microbiológicos, expressão dos resultados, valores de referência e métodos analíticos a utilizar para águas recreativas (circular normativo nº14/DA de 21/08/2009). ....	10
Tabela 5 - Parâmetros a analisar e valores limites segundo a classificação das águas balneares interiores (Anexo I, Decreto lei n.º 113/2012) .....	12

Tabela 6 - Parâmetros a analisar e valores limites segundo a classificação das águas balneares costeiras e de transição (Anexo 1, Decreto lei n. 0113/2012).....	12
Tabela 7 – Termos usados para descrever a relação dos microrganismos com o oxigénio .....	17
Tabela 8 - Grupos de alimentos prontos a comer (Fonte: Santos et al, 2005).....	23
Tabela 9 - Meios de cultura usados nas análises microbiológicas dos diferentes tipos de águas.....	37
Tabela 10 - Meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas dos alimentos, dos manipuladores e superfícies. ....	38
Tabela 11 – Interpretação dos possíveis resultados observáveis nos tubos com meio de cultura TSI. ....	56
Tabela 12 - Quadro Resumo do procedimento realizado para validação do meio de cultura cromogénico.....	85

## Lista de Abreviaturas

- ACH – Água para consumo humano
- APA – Agência Portuguesa do Ambiente
- BCYE – *Buffered Charcoal Yeast Extract*
- BEA – *Bile Esculina Agar*
- BG – Brilliant Green Agar
- BP – *Baird Parker Agar*
- BPF – Boas Práticas de Fabrico
- BPH – Boas Práticas de Higiene
- CCA – *Chromogenic Coliform Agar*
- CAC – *Codex Alimentarius Commission*
- CN – *CN Pseudomonas Agar*
- DRBC – *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar*
- ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
- HACCP – *Hazard Analysis Critical Control Points*
- INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge



IPAC – Instituto Português de Acreditação

IPQ – Instituto Português da Qualidade

ISO – *International Organization for Standardization*

L - Litro

m-CP – *Membrane Clostridium Perfringens*

mL - mililitro

MKTTn – *Caldo de Muller Kauffmann Tetrionato*

MR – Material de Referência

MSA – *Manitol Salt Agar*

MUG – 4 – metil-lumbeliferil –  $\beta$  – D – glucuronidase

MYP – *Mannitol Egg Yolk Polymyxin*

NMP – Número Mais Provável

OCLA – *Chromogenic Listeria Agar*

PCA – *Plate Count Agar*

RVS – *Rappaport Vassiliadis Soy*

SB – *Slanetz and Bartley*

TBX – *Tryptone Bile X-glucuronide Agar*

TSC – *Tryptose Sulfite Cycloserine Agar*

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UV - Ultravioleta

VRBG – *Violet Red Bile Glucose Agar*

VRBL – *Violet Red Bile Lactose Agar*

XLD – *Xilose lisina desoxicolato Agar*

YEA – *Yeast Extract Agar*

$\mu$ L - Microlitro



## I. Introdução

## Organização do relatório de estágio

O relatório de estágio aqui apresentado está dividido em 4 capítulos (Introdução, Revisões Bibliográficas, Parte Experimental e Conclusão).

No primeiro capítulo, Introdução, são apresentados os objetivos principais do estágio curricular e é feita uma breve apresentação do local onde este decorreu.

No capítulo, Revisões Bibliográficas, é apresentada a pesquisa realizada para melhor compreensão do trabalho prático efetuado.

No capítulo, Parte Experimental, são apresentadas todas as atividades realizadas e as respetivas metodologias.

No último capítulo, Conclusão, é realizada uma avaliação global do estágio.

## Objetivos do Trabalho

O trabalho apresentado neste relatório foi desenvolvido no âmbito do estágio curricular em contexto empresarial, do Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em parceria com a Universidade do Minho, que teve lugar no laboratório de microbiologia, na empresa MicroChem - Ensaios e Análises Técnicas, Lda, que teve a duração de 9 meses. Foi orientado pela Engenheira Sílvia Silva, diretora técnica da MicroChem e pelo Professor Doutor José Américo Pereira de Sousa, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

O estágio teve como objetivo a integração do estagiário em ambiente laboratorial e empresarial, permitindo a compreensão do funcionamento e da organização de um laboratório acreditado. O estagiário teve como principais funções a realização de análises microbiológicas a alimentos, águas, manipuladores e superfícies, através de métodos analíticos acreditados, e a preparação de meios de cultura e o respetivo controlo de qualidade. Foi iniciado um trabalho relativo à validação de um novo meio de cultura, por comparação deste com o meio indicado na norma de referência, para a deteção e enumeração de espécies de *Legionella*, nas águas. O estagiário teve também a oportunidade de ajudar na implementação do método NMP (Número Mais Provável), para a análise microbiológica às águas balneares, participando na elaboração do procedimento técnico da empresa, tendo por base as normas ISO 7899-1:1998 e ISO 9308-3:1998, e na realização de ensaios. Ao estagiário foi, ainda, possível assistir à

auditoria externa realizada pelo IPAC, e à realização de ensaios Interlaboratoriais (intercalibrações).

## A empresa

A MicroChem - Ensaios e Análises Técnicas, Lda, fundada em 2006 e localizando-se no centro empresarial da lionesa, em Leça do Balio, é um laboratório que realiza análises nas áreas alimentares, ambientais e técnicas. O laboratório disponibiliza, aos seus clientes, equipamentos de amostragem automáticos e um serviço de amostragem efetuado por técnicos qualificados.

A MicroChem possui uma filosofia assente na qualidade, rigor e disciplina, executando as suas funções com objetivos focados na excelência do serviço prestado, privilegiando a garantia e a credibilidade dos resultados emitidos. É um laboratório acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) de acordo com a norma ISO 17025 de 2005, tendo-lhe sido atribuído o Anexo Técnico de Acreditação nº L0499. A acreditação do laboratório é essencial para credibilizar e conferir transparência e qualidade a todo o processo analítico. No que se refere aos ensaios microbiológicos, a acreditação também é imposta pela legislação vigente e, por consequência, pelos clientes que procuram estes serviços. Ao todo, o laboratório tem implementados e acreditados 57 ensaios, a maior parte dos quais na área da microbiologia.

O laboratório faz ainda parte da lista de laboratórios aptos para a realização de análises de águas destinadas ao consumo humano, no âmbito do Decreto-Lei nº306/2007, emitida pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR) e, é um membro ativo em Comissões Técnicas de normalização nacionais (IPQ) e internacionais (ISO).

## **II. Revisões Bibliográficas**

# Importância da Água

A água é um recurso essencial à vida, indispensável para a humanidade, mas também para os outros organismos e para a manutenção das funções e da integridade dos ecossistemas (Ferreira e Sousa, 1998). O homem, enquanto consumidor, depende da água de forma absoluta. A sua ingestão é fundamental para o nosso organismo, sendo essencial para a regulação da temperatura do corpo e para o bom funcionamento dos órgãos. A Direção-Geral de Saúde (DGS) recomenda a ingestão de 1,5 a 2 litros de água por dia, no conjunto da dieta alimentar.

A água potável é um elemento fundamental para o desenvolvimento sustentável dos países. Nos países pobres e em desenvolvimento, o acesso a água limpa e saneamento não existe, e as infeções transmitidas pela água são comuns. Dois mil e quinhentos milhões de pessoas não têm acesso a saneamento e mais de 1,5 milhões de crianças morrem a cada ano de doenças diarreicas (Fenwick, 2006; Cabral, 2010). As infeções transmitidas pela água ocorrem quando um microrganismo infeccioso é adquirido por meio da água contaminada por matéria fecal, contendo patógenos humanos ou de animais homeotérmicos. Quando estes patógenos contaminam a rede de abastecimento público ou outras fontes de água potável utilizadas por muitas pessoas, podem ocorrer surtos epidémicos (Pelczar *et al.*, 1997). O destino adequado destes excrementos é um pré-requisito para a existência de água potável, segura do ponto de vista da saúde pública.

A procura das águas naturais para fins recreativos e de lazer, como por exemplo natação, hidroginástica, pesca e surf, entre outras, é cada vez maior, estando estas águas sujeitas a um maior risco de poluição, seja de origem microbiana, química ou física. A poluição microbiana pode ter origem em descargas de águas residuais municipais, de águas residuais industriais, de fossas sépticas particulares e do escoamento de águas pluviais (Budnick *et al.*, 1996). Em termos gerais, os maiores riscos microbianos estão associados à ingestão de água contaminada com fezes humanas ou animais (Grabow, 1996; WHO, 2008).

A água pode ser uma potencial fonte de contaminação dos alimentos, sendo a sua qualidade de grande importância, uma vez que a sua utilização é essencial desde a produção até ao consumo dos géneros alimentícios. A água é utilizada para lavar, preparar e cozinhar alimentos, para lavagens de recipientes, equipamentos, utensílios e mãos (Lacasse, 1995; Pinto e Neves, 2008).

Por ser um recurso natural escasso, a água deve ser protegida, defendida e adequadamente tratada e utilizada, em especial as águas de superfície, que são fontes renováveis com uma capacidade limitada de recuperação dos impactos adversos decorrentes das atividades humanas (Diretiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho).

## Conceito de qualidade da água

O conceito de qualidade da água é relativo, já que depende do uso a que se destina ou do objetivo do seu utilizador. Assim, a qualidade da água pode ser definida, para fins específicos, como o conjunto de características físicas, químicas e biológicas adequadas à sua utilização para determinado uso. Para cada uso da água é, pois, necessário estabelecer as exigências relativas à sua qualidade, isto é, definir parâmetros de qualidade e estabelecer os seus valores-limite (Ferreira e Sousa, 1998).

Os limites paramétricos estabelecidos na legislação são principalmente desenvolvidos para a prevenção da ocorrência de surtos sanitários, fornecendo pouca informação sobre a proteção do ambiente e da saúde. Na legislação, normalmente, são impostos dois limites paramétricos, o valor máximo recomendável (VMR) e o valor máximo admissível (VMA). O VMR é o valor de norma de qualidade que, de preferência, deve ser respeitado ou não excedido. O VMA é o valor da norma de qualidade que não deverá ser ultrapassado (Decreto lei nº236/98). Como nem sempre os valores obtidos são  $\leq$  VMR, toma-se em conta o VMA, na perspetiva de que nesse intervalo de valores (VMR-VMA) não se verificarão riscos significativos para a saúde dos consumidores (Abelho, 2010).

Nenhuma água é boa para todos os fins. Nesta perspetiva, não existe nenhuma água cuja qualidade seja boa, em valor absoluto. Uma água serve para determinados fins, e é para esses, e só para esses, que tem qualidade para ser utilizada (Ferreira e Sousa, 1998).

O Decreto-Lei nº236/98 de 1 de agosto define quatro tipos principais de utilização da água: águas para consumo humano, águas para suporte de vida aquícola, águas balneares e águas de rega.



As águas para consumo humano são águas doces que podem ter origem em águas superficiais, em águas subterrâneas ou em águas de abastecimento. As águas balneares são águas doces lóxicas e lânticas, comumente designadas de correntes e paradas, assim como a água do mar e as águas estuarinas que se encontrem classificadas como águas balneares ou, não estando classificadas, onde o banho não esteja interdito e seja habitualmente praticado por um número considerável de banhistas (aproximadamente 100/dia, durante a época balnear) (artigo 3º do Decreto-Lei n.º 236/98).

## Quadro Legal Aplicado à Qualidade da água

### Água destinada ao consumo humano

A água de abastecimento humano deve apresentar qualidade de modo que, quando for consumida, seja agradável e não prejudicial à saúde. Isso exige infraestruturas e uma rede de distribuição que se devem encontrar em boas condições de operação e manutenção (Santos, 2011).

As águas para o consumo humano são regulamentadas pelo Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, que estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano. Este regulamento define como água destinada ao consumo humano:

- Toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais;
- Toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinadas ao consumo humano, assim como a utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que podem estar em contacto com os alimentos, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada.

O Decreto-Lei n.º 306/2007 estabelece:

- Os requisitos legais da qualidade da água destinada ao consumo humano;

- As obrigações relativas à garantia dos parâmetros da qualidade da água disponibilizada;
- O programa de controlo da qualidade da água;
- O procedimento nas situações de incumprimento;
- As regras de aptidão dos laboratórios de ensaios;
- As regras de fiscalização e regime contraordenacional.

Os valores paramétricos e os parâmetros microbiológicos que a água destinada ao consumo humano deve respeitar são divididos em duas partes, uma relativa à água fornecida por redes de distribuição, fontanários, camiões ou navios-cisterna, reservatórios e utilizada na indústria alimentar (tabela 1) e outra relativa à água colocada à venda em garrafas ou noutros recipientes (tabela 2).

**Tabela 1-** Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para a água fornecida por redes de distribuição, fontanários, camiões ou navios-cisterna, reservatórios e água utilizada na indústria alimentar (Decreto-Lei n.º 306/2007, anexo I, parte I)

Parâmetro	Valor Paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i>	0	Número/100 ml
<b>Enterococos</b>	0	Número/100 ml

**Tabela 2 -** Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para a água colocada à venda em garrafas ou outros recipientes (Decreto-Lei n.º 306/2007, anexo I, parte I).

Parâmetro	Valor Paramétrico	Unidade
<i>Escherichia coli</i>	0	Número/250 ml
<b>Enterococos</b>	0	Número/250 ml
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0	Número/250 ml
<b>Número de colónias a 22°C.</b>	100	Número/ ml
<b>Número de colónias a 36°C.</b>	20	Número/ml

O controlo da qualidade da água da rede de abastecimento, segundo o ponto 1 do artigo 10º do Decreto-Lei n.º 306/2007, efetua-se de acordo com o mencionado no seu anexo II. O anexo II tem por objetivo definir os controlos de rotina e inspeção, assim como as frequências mínimas de amostragem, para a análise da água destinada ao consumo humano. O controlo de rotina tem como objetivo fornecer regularmente informações sobre a qualidade organolética e microbiológica da água destinada ao consumo humano, bem como sobre a eficácia dos tratamentos existentes, especialmente a desinfecção, tendo em vista determinar a conformidade da água com os valores

paramétricos estabelecidos. O controlo de inspeção tem como objetivo obter as informações necessárias para verificar o cumprimento dos valores paramétricos.

**Tabela 3** - Parâmetros microbiológicos a analisar nos controlos de rotina (Decreto-Lei n.º 306/2007, anexo II).

Controlo de Rotina 1	Controlo de Rotina 2
Bactérias coliformes	<i>Clostridium perfringens</i> (incluindo esporos)
	Número de colónias a 22°C
Escherichia coli	Número de colónias a 36°C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Os ensaios de controlo de qualidade da água só podem ser realizados por laboratórios de ensaio acreditados pelo IPAC, e devem ser realizados com recurso aos seguintes métodos analíticos:

- Bactérias coliformes e *Escherichia coli* - (ISO 9308 -1);
- Enterococos (ISO 7899 -2);
- *Pseudomonas aeruginosa* (EN ISO 12780);
- Enumeração de microrganismos viáveis — número de colónias a 22°C (EN ISSO 6222);
- Enumeração de microrganismos viáveis — número de colónias a 37°C (EN ISO 6222);
- *Clostridium perfringens* (incluindo esporos) – filtração em membrana seguida de incubação anaeróbica da membrana em m-CP ágar a 44°C ± 1°C durante 21±3 horas. Contagem das colónias amarelas opacas que passam a rosa ou vermelho após exposição, durante vinte a trinta segundos, a vapores de hidróxido de amónio.

## Piscinas

As águas das piscinas, especialmente das piscinas públicas, podem representar um risco para a saúde. As piscinas podem estar envolvidas na transmissão de infeções dos olhos, do nariz, da garganta e do trato intestinal; elas podem também disseminar o pé-de-atleta e outras infeções cutâneas (Pelczar *et al.*, 1997). Assim, a qualidade sanitária da água deve ser rigorosamente controlada.

A legislação vigente para as águas recreativas (piscinas) está descrita na Circular Normativa nº 14/DA de 21/08/2009. Os parâmetros microbiológicos a analisar na água, a expressão dos resultados, os valores de referência e os métodos analíticos a utilizar são os referidos na tabela 4.

**Tabela 4** - Parâmetros microbiológicos, expressão dos resultados, valores de referência e métodos analíticos a utilizar para águas recreativas (circular normativo nº14/DA de 21/08/2009).

Parâmetros Microbiológicos	Expressão dos resultados	Valores de referência		Métodos Analíticos
		VR	VL	
<b>Microrganismos cultiváveis a 36°C</b>	UFC/ 1 ml	≤ 100*	-	ISO 6222
<b>Bactérias Coliformes</b>	UFC/ 100 ml	-	10	ISO 9308-1 modificada
<b><i>Escherichia coli</i></b>	UFC/ 100 ml	-	0	ISO 9308-1 modificada
<b>Enterococos</b>	UFC/ 100 ml	-	0	ISO 7899-2
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	UFC/ 100 ml	-	0	ISO 12780 modificada
<b>Estafilococos produtores de coagulase</b>	UFC/ 100 ml	-	0**	NP - 4343
<b>Nº total de estafilococos</b>	UFC/ 100 ml	≤ 20*	-	NP - 4343
<b><i>Legionella</i>***</b>	N.º/1000 ml	<10 <sup>2</sup>	>10 <sup>3</sup>	ISO 11731:1998

VR – Valor Recomendado; VL – Valor Limite;

\* O Valor Recomendado poderá ser ultrapassado uma vez por época de abertura ao público ou por ano civil;

\*\* 0/100 ml em 90% das amostras, sendo da responsabilidade dos serviços de saúde locais efetuar a avaliação no final da época ou ano civil;

\*\*\* Em tanques de hidromassagem

O número de colónias de *Legionella sp.* por 1000 ml de água deve ser inferior a 10<sup>2</sup>. Se o valor se encontrar entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> é aconselhável esvaziar, limpar e desinfetar o tanque de hidromassagem e acessórios. Após o enchimento do tanque, deve efetuar-se nova análise no dia seguinte e após 2-4 semanas. Se o número de *Legionella sp.* for superior a 10<sup>3</sup> ou se for detetada *Legionella pneumophila*, o tanque deve ser encerrado imediatamente e deve ser feita uma desinfecção de choque, com 50 mg/L de cloro livre em circulação, durante 1 hora. De seguida, drena-se, limpa-se e desinfeta-se o tanque e os acessórios. Após o enchimento do tanque, deve efetuar-se uma nova análise no

dia seguinte e após 2-4 semanas. Manter encerrado o tanque até ausência de deteção de *Legionella spp.* e até a avaliação de risco dar resultados satisfatórios.

### *Legionella sp.*

Em Portugal, segundo a Portaria nº353 – A/2013, a concentração de bactérias *Legionella sp.*, na matriz água, tem de ser inferior a 100 UFC/L, exceto no caso da pesquisa em tanques de torres de arrefecimento em que pode verificar-se uma concentração inferior a 1000 UFC/L. A presença da bactéria *Legionella pneumophila* não é permitida.

## Águas minerais naturais

Em Portugal a legislação aplicada às águas minerais naturais e às águas de nascente é a Portaria n. °1220/2000. Segundo esta, as águas minerais naturais utilizadas nos estabelecimentos termais, para serem consideradas bacteriologicamente próprias, têm de estar isentas de:

- Parasitas e microrganismos patogénicos;
- *Escherichia coli* e outros coliformes, em 250 mL de amostra analisada;
- Estreptococos fecais, em 250 mL de amostra analisada;
- Anaeróbios esporulados sulfito-redutores, em 50 mL de amostra analisada;
- *Pseudomonas aeruginosa*, em 250 mL de amostra analisada;
- *Legionella pneumophila*, em 1 L de amostra analisada.

O valor de referência para o número total de legionela *não L. pneumophila* é de 100 UFC/ L. O teor total de microrganismos viáveis, após cultura em meio de agar nutritivo, não deve ultrapassar:

- Para a água mineral natural utilizada nos estabelecimentos termais, por ingestão e em contacto com as mucosas respiratórias, oculares e com outras mucosas internas:

- 20 UFC por 1 mL de amostra, entre 20 a 22°C, às 72 h de incubação;
- 5 UFC por 1 mL de amostra, a 37°C, às 24 h de incubação.

- Para a água mineral natural utilizada nos estabelecimentos termais, por via externa (banhos e duchas):

- 100 UFC por 1 mL de amostra, entre 20 a 22°C, às 72 h de incubação;
- 20 UFC por 1 mL de amostra, a 37°C, às 24 h de incubação.

## Águas balneares

As águas balneares são regulamentadas pelo Decreto-Lei n.º 113 de 2012. A Agência Portuguesa do Ambiente, enquanto autoridade nacional da água, é a entidade competente para a coordenação e fiscalização da aplicação deste Decreto-lei.

Nas águas balneares os parâmetros a analisar são o número de *Enterococos* intestinais segundo a norma ISO 78991 ou ISO 79882, e de *Escherichia coli* segundo a norma ISO 9308 3 ou ISO 9308 1. As águas balneares são avaliadas e são classificadas como “más”, de qualidade aceitável, de qualidade boa ou de qualidade excelente, segundo os critérios estabelecidos para os parâmetros microbiológicos (tabela 5 e tabela 6).

**Tabela 5** - Parâmetros a analisar e valores limites segundo a classificação das águas balneares interiores (Anexo I, Decreto lei n.º 113/2012)

Parâmetro	Qualidade excelente	Qualidade boa	Qualidade aceitável
<b><i>Enterococos</i> intestinais em UFC/100 ml</b>	(*)200	(*)400	(**)330
<b><i>Escherichia coli</i></b>	(*)500	(*)1000	(**)900

(\*) com base numa avaliação de percentil 95. V. anexo III

(\*\*) com base numa avaliação de percentil 90. V. anexo III

**Tabela 6** - Parâmetros a analisar e valores limites segundo a classificação das águas balneares costeiras e de transição (Anexo 1, Decreto lei n.º 113/2012)

Parâmetro	Qualidade excelente	Qualidade boa	Qualidade aceitável
<b><i>Enterococos</i> intestinais em UFC/100 ml</b>	(*)100	(*)200	(**)185
<b><i>Escherichia coli</i></b>	(*)250	(*)500	(**)500

(\*) com base numa avaliação de percentil 95. V. anexo III

(\*\*) com base numa avaliação de percentil 90. V. anexo III

O anexo III do Decreto lei n.º 113/2012 define a avaliação e a classificação das águas balneares. As águas balneares são classificadas como “más” se no conjunto dos dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação<sup>1</sup>, os valores de percentil<sup>2</sup> para os parâmetros microbiológicos forem piores<sup>3</sup> que o valor de “qualidade aceitável” indicado nas tabelas 5 e 6. As águas balneares são classificadas como “aceitáveis” se, no conjunto dos dados recolhidos sobre a qualidade

<sup>1</sup> Por último «período de avaliação», entendem-se as quatro últimas épocas balneares ou, eventualmente, o período especificado com base no n.º 4 do artigo 7.º.

<sup>2</sup> Com base na avaliação do percentil na função normal da densidade de probabilidade log10 dos dados microbiológicos obtidos numa determinada água balnear

<sup>3</sup> «Pior» significa com valores de concentração superiores expressos em UFC/100 ml.

das águas balneares para o último período de avaliação, os valores de percentil para as contagens microbiológicas forem iguais ou melhores<sup>4</sup> que o valor de “qualidade aceitável” indicado nas tabelas 5 e 6. As águas balneares são classificadas como “boas”, se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação, os valores de percentil para as contagens microbiológicas forem iguais ou melhores aos valores de “boa qualidade” indicados nas tabelas 5 e 6. As águas balneares são classificadas como excelentes, se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação, os valores de percentil para as contagens microbiológicas forem iguais ou melhores aos valores de “excelente qualidade” indicados nas tabelas 5 e 6.

As águas balneares de qualidade aceitável, boa ou excelente podem apresentar uma poluição de curta duração desde que:

- Estejam a ser tomadas medidas de gestão adequadas, incluindo a vigilância, os sistemas de alerta precoce e a monitorização, para evitar a exposição dos banhistas através de uma advertência e, se necessário, de um desaconselhamento ou interdição da prática balnear.
- Estejam a ser tomadas medidas de gestão adequadas para prevenir, reduzir ou eliminar as causas da poluição.
- O número de amostras não consideradas, devido a poluição de curta duração durante o último período de avaliação não represente mais de 15% do número total de amostras previstas nos calendários de amostragem fixados para esse período, ou mais do que uma amostra por época balnear, sendo o nível a considerar o mais elevado.

---

<sup>4</sup> «Melhor» significa com valores de concentração inferiores expressos em UFC/100 ml.

# Microbiologia dos Alimentos

É sabido que alguns microrganismos são utilizados na produção de numerosos produtos alimentares (bebidas fermentadas, queijo, pão, iogurtes, *etc.*), sendo indispensáveis à sua obtenção e apresentando assim um efeito benéfico na alimentação humana, enquanto outros têm a capacidade de deteriorar os alimentos, alterando as características organolépticas destas, e levando a uma não aceitação do produto por parte do consumidor. Apenas um pequeno número de diferentes tipos de microrganismos, os chamados microrganismos patogénicos, possui a capacidade de causar doenças. Estes podem causar infeções ou intoxicações alimentares (Trickett, 2001). Os microrganismos patogénicos e as suas toxinas, transmitidos pelos alimentos, são a causa de inúmeros casos de doenças de origem alimentar, em todo o mundo (Lacasse, 1995). Contudo, muitos destes microrganismos causam sintomas leves ou semelhantes a uma gripe e a vítima não procura auxílio médico; como consequência, a maior parte dos casos de doenças transmitidas por alimentos não são notificados (Pinto, 1996).

O comércio internacional de alimentos e as viagens internacionais estão em crescimento, proporcionando benefícios sociais e económicos. Mas tal facto também facilita a propagação de doenças à escala mundial (CAC, 2003). Com a facilidade de partilha de informação e conhecimento, na atualidade, os consumidores estão mais atentos e têm uma maior preocupação com a segurança e a qualidade dos alimentos que ingerem (ICMSF, 2006). Numa sociedade cada vez mais exigente com os vetores da qualidade, a área alimentar não constitui exceção (Serrazina, 2013). Os consumidores exigem qualidade, ausência de conservantes químicos e alimentos seguros (Forsythe, 2000).

## Contaminação biológica dos alimentos

De todos os microrganismos que intervêm na alimentação, as bactérias são o grupo mais importante, não só pelo número como também pela diversidade e frequência de ações (Ferreira e Sousa, 2000). A maioria dos alimentos contém microrganismos, a não ser que tenham sido esterilizados.

Os alimentos são facilmente contaminados com microrganismos, durante a manipulação e o processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio de cultura ideal para o crescimento dos microrganismos, uma vez que contém



substâncias nutritivas (Pelczar *et al.*, 1997). Na indústria, os alimentos podem ser contaminados durante a etapa de processamento devido ao mau funcionamento ou limpeza inadequada do equipamento, uso de material de limpeza não indicado para a finalidade, infestações de insetos e roedores ou, ainda, devido a um armazenamento inadequado (Alimentar, P.D.S). A contaminação microbiana pode ocorrer durante as diferentes manipulações, através de utensílios, superfícies e equipamentos mal higienizados que contactem com os alimentos e os contaminem (Baptista e Linhares, 2005).

A contaminação cruzada é uma das vias de contaminação mais frequentes, associada às doenças de origem alimentar. Consiste na transferência de agentes patogénicos de uma fonte contaminada para um alimento não contaminado, seja por contacto direto ou pelos agentes que manipulam os alimentos, por superfícies de contacto ou até através do ar (CAC, 2003).

Os manipuladores de alimentos são considerados uma das principais fontes, de maior importância, na transferência de microrganismos para os alimentos (OMS, 1989; Rane, 2011). Numerosos surtos de doenças de origem alimentar têm origem nas mãos contaminadas, sujas ou mal lavadas, dos manipuladores de alimentos (Ayçiçek *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006).

É, portanto, necessário garantir princípios de higiene durante a preparação, confeção e armazenamento dos alimentos. Estes princípios dizem respeito à higiene pessoal dos manipuladores de alimentos, à forma como são manipulados, servidos ou conservados e à higiene das cozinhas e instalações onde são confeccionados e conservados (Nunes e Breda, 2001).

## Fatores determinantes no desenvolvimento dos microrganismos

Como qualquer ser vivo, os microrganismos necessitam de determinadas condições para crescerem e se desenvolverem. É fundamental conhecer os fatores que favorecem ou inibem o crescimento microbiano, em alimentos, para que se consiga prevenir situações capazes de colocar em risco a saúde do consumidor. Na área das análises microbiológicas, conhecer as necessidades dos microrganismos é essencial, quer na formulação de novos meios de cultura, quer nos ensaios, em si, de forma a obter-se resultados o mais fiáveis possíveis. Na indústria é importante para melhorar a

conservação de produtos perecíveis ou assegurar suficiente quantidade de produtos formados em processos de fermentação (Pelczar *et al*, 1997).

São vários os fatores extrínsecos e intrínsecos aos alimentos que afetam o desenvolvimento microbiano. Os fatores intrínsecos estão relacionados com os próprios alimentos, incluem o pH, o teor de humidade, a atividade da água o potencial de oxidação-redução, os nutrientes disponíveis, os constituintes antimicrobianos e as estruturas biológicas. O pH de um alimento é de extrema importância, atendendo a que valores baixos de pH favorecem o crescimento de leveduras e bolores. A maior parte dos microrganismos multiplica-se melhor a valores de pH à volta de 7. O potencial de oxidação-redução é um parâmetro que influencia a deterioração dos alimentos. Além da água os microrganismos requerem, para o seu desenvolvimento, determinados constituintes, incluindo uma fonte de energia, uma fonte de azoto, vitaminas e minerais. Os bolores são os germes com menor grau de exigência, seguidos pelas leveduras, bactérias de Gram negativo e por fim as bactérias de Gram positivo (Ferreira e Sousa, 1998). Os fatores extrínsecos são relativos às características ambientais, nas quais são mantidos os alimentos durante o seu armazenamento, como a temperatura, a humidade relativa, e a presença e concentração de gases. A temperatura e a humidade relativa podem determinar a alteração microbiana dos alimentos. A valores altos de humidade a multiplicação microbiana inicia-se mais rapidamente, mesmo em condições de baixas temperaturas (Ferreira e Sousa, 1998). Os alimentos secos quando colocados em locais com elevada humidade, podem absorver água à sua superfície, o que vai permitir o desenvolvimento de microrganismos (Pinto e Neves, 2008).

Relativamente à temperatura, os microrganismos podem ser classificados como:

- Psicrófilos – Sobrevivem a temperaturas compreendidas entre os -10°C e os 20°C.
- Mesófilos - Sobrevivem a temperaturas compreendidas entre os 10°C e os 50°C.
- Termófilos - Sobrevivem a temperaturas compreendidas entre os 40°C e os 70°C.
- Hipertermófilos - Sobrevivem a temperaturas compreendidas entre os 65°C e os 100°C.
- Hipertermófilos extremos - Sobrevivem a temperaturas compreendidas entre os 80°C e os 110°C.

Os microrganismos mais preocupantes na área da segurança alimentar são sobretudo os mesófilos, uma vez que a temperatura ótima de crescimento para a maioria dos

patogénicos é perto dos 37°C. À temperatura de refrigeração as bactérias podem multiplicar-se, mas mais lentamente, reduzindo a sua atividade metabólica. O binómio tempo/temperatura utilizado durante o processamento e armazenamento do alimento é fundamental, para inibir a multiplicação de microrganismos patogénicos (Lacasse, 1995).

A presença ou ausência de oxigénio livre é determinante no crescimento microbiano. A atmosfera onde os alimentos são conservados é muito importante, considerando-se atmosferas controladas ou modificadas quando existem quantidades de CO<sub>2</sub> à volta de 10%. O comportamento dos microrganismos face ao oxigénio é variável (tabela 7). Os microrganismos aeróbios obrigatórios estão dependentes da respiração aeróbia para fazer face às suas exigências energéticas, utilizando assim o oxigénio molecular como aceitador final de eletrões. Pelo contrário, a sua presença é-lhes letal, pois leva à produção de peróxidos e radicais livres de oxigénio, como o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Por outro lado, os microrganismos anaeróbios obrigatórios obtêm energia por processos que não envolvem a utilização de oxigénio (Ferreira e Sousa, 1998). Estes crescem facilmente em alimentos enlatados ou embalados a vácuo.

**Tabela 7** – Termos usados para descrever a relação dos microrganismos com o oxigénio

Grupo	Ambiente		Efeito do Oxigénio
	Aeróbio	Anaeróbio	
<b>Aeróbio obrigatório</b>	Crescimento	Sem crescimento	Necessário (utilizado para a respiração aeróbia)
<b>Microaerófilo</b>	Crescimento, se os níveis de oxigénio forem baixos	Sem crescimento	Necessário, mas a níveis inferiores a 0,2 atm
<b>Anaeróbio obrigatório</b>	Sem crescimento	Crescimento tóxico	Não cresce em ambientes com oxigénio
<b>Anaeróbio facultativo</b>	Crescimento	Crescimento	Não é necessário para o crescimento, mas é utilizado quando disponível
<b>Anaeróbio aerotolerante</b>	Crescimento	Crescimento	Não necessário, nem utilizado

## Doenças de origem alimentar (DOA)

Estima-se que as doenças provocadas por microrganismos equivalem a 90% das doenças transmitidas por alimentos (ASAE, 2017). As DOA são definidas pela WHO como doenças infecciosas ou tóxicas, proveniente, ou que se presume, pelo consumo de alimentos ou de água contaminados (Tirado e Schmidt, 2001). As duas categorias de doenças microbianas transmitidas por alimentos são: intoxicação alimentar e infeções transmitidas por alimentos. Toxinfecção alimentar, é um termo frequentemente utilizado para englobar as infeções alimentares, que ocorrem quando é ingerido um alimento contaminado com um microrganismo patogénico, o qual coloniza o hospedeiro, multiplicando-se no seu trato gastrointestinal. As intoxicações alimentares ocorrem após a ingestão de alimentos contaminados com toxinas produzidas por microrganismos, sendo a toxina responsável pelos sintomas clínicos (Pelzacar *et al.*, 1997; Candeias, 2014). As toxinfecções alimentares são um grave problema em saúde pública, constituindo uma importante causa de morbilidade e mortalidade em todo o mundo, particularmente para grupos populacionais de risco, onde se incluem: idosos, crianças, grávidas e imunodeprimidos (Correia, 2013).

## Segurança Alimentar

A segurança alimentar, segundo o *Codex Alimentarius*, é definida como a garantia de que os alimentos não provocarão danos ao consumidor, desde que sejam preparados ou ingeridos de acordo com a sua utilização prevista, estando intrinsecamente ligada à higiene dos géneros alimentícios.

A higiene dos géneros alimentícios, segundo o Regulamento (CE) nº 852/2004, é definida como o conjunto de medidas e condições necessárias para controlar os perigos e assegurar que os géneros alimentícios são próprios para consumo humano.

As falhas na segurança alimentar têm implicações significativas, podem causar prejuízos ao comércio e ao turismo, e dão origem a perdas de rendimento, desemprego e litígio. A deterioração dos alimentos, devido a microrganismos, representa um desperdício, é dispendiosa e pode prejudicar o comércio e a confiança dos consumidores (Trickett, 2001).

Os principais responsáveis pela segurança dos géneros alimentícios são definidos, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 852/2004, como sendo todos os operadores do setor alimentar. Todos os intervenientes, incluindo agricultores e produtores de animais, fabricantes e processadores, manipuladores de alimentos e até os consumidores, têm a responsabilidade de assegurar que os alimentos são seguros e adequados ao consumo (CAC, 2003). É necessária uma abordagem integrada para garantir a segurança dos alimentos, desde a produção primária até à colocação no mercado, isto é, ao longo de toda a cadeia alimentar, “do prado ao prato”:

De forma a garantir que não sejam colocados à disposição do consumidor alimentos não seguros, a indústria alimentar tem de analisar todos os possíveis perigos, e eliminá-los ou reduzi-los para níveis aceitáveis, segundo o *Hazard Analysis Critical Control Points* (HACCP) (National, 1998). O HACCP é o programa de gestão da segurança alimentar mais importante e eficaz. Consiste na identificação e avaliação de perigos específicos e na implementação de medidas para o seu controlo, bem como medidas corretivas a desencadear quando as formas de controlo não são eficazes (Gomes, 2010). O Decreto-lei n.º 67/98 obriga a que todas as empresas que preparem, fabriquem, transformem, embalem, transportem, distribuam, manipulem ou comercializem, independentemente da sua natureza ou dimensão, apliquem sistemas de segurança alimentar (designados de sistemas de autocontrolo), baseados nos princípios do HACCP. O sistema HACCP só é eficaz se antes se assegurarem alguns pré-requisitos, como as Boas Práticas de Higiene e as Boas Práticas de Fabrico (Gomes, 2010). As BPF referem-se aos princípios, procedimentos e meios fundamentais indispensáveis para fornecer um ambiente adequado para a produção de alimentos com qualidade aceitável. Por outro lado, as BPH descrevem medidas básicas de higiene que os estabelecimentos devem manter (Jouve *et al.*, 1998). Os requisitos do sistema HACCP deverão ter em consideração os princípios constantes do *Codex Alimentarius*, devendo ter a flexibilidade suficiente para serem aplicáveis em todas as situações, sem que, contudo, essa flexibilidade comprometa os objetivos de higiene estabelecidos (Hilário, 2011).

De forma a evitar as doenças alimentares provocadas por microrganismos, no início dos anos 90, a OMS publicou “As dez regras de ouro para a preparação de alimentos seguros”. No entanto, tornou-se evidente a necessidade de algo mais simples e de aplicação geral, tendo sido criado em 2001 o poster das “Cinco chaves para uma alimentação mais segura”. Neste documento as BPF e as BPH essenciais para manter a higiene e segurança alimentar e, minimizar os casos de contaminação alimentar, são resumidas, de forma simples, a cinco chaves: manter a limpeza, separar os alimentos

crus dos cozinhados, cozinhar bem os alimentos, manter os alimentos a temperaturas seguras e utilizar água e matérias-primas seguras (OMS, 2006). É importante que os manipuladores dos alimentos, sejam formados e informados sobre higiene alimentar. Só através de eficazes e permanentes programas de formação e consciencialização dos manipuladores será possível produzir e oferecer ao consumidor alimentos seguros, inócuos e com propriedades nutricionais que satisfaçam um consumidor cada vez mais exigente e informado (Calaça, 2003).

## CrITÉRIOS MicrobiolÓgicos

Os critérios microbiológicos “definem a aceitabilidade de um produto ou de um lote alimentar, baseado na ausência ou presença, ou número de microrganismos incluindo parasitas, e/ou quantidade de toxinas/metabolitos, por unidade de massa, volume, área ou lote” (CAC, 1997; HPA, 2009)

Os critérios microbiológicos são usados, normalmente, para avaliar microbiologicamente o estado dos alimentos em qualquer ponto da cadeia de produção alimentar, ajudando a definir se o lote de alimentos é aceitável ou não. Os critérios microbiológicos também podem ser utilizados para avaliar o correto funcionamento dos sistemas de gestão de segurança alimentar, como as Boas Práticas de Fabrico, as Boas Práticas de Higiene e a implementação de um sistema HACCP (Whiting *et al.*, 2006; HPA, 2009).

A escolha dos critérios microbiológicos e a consequente interpretação do estado dos alimentos depende do tipo de alimento, dos ingredientes usados e do estado dos mesmos (crus ou cozinhados), do tipo de processamento a que estão sujeitos, do nível de manuseamento após processamento, do tipo de embalagem e do processo de distribuição e armazenamento do produto final (NSWFA, 2009)

Existem 3 tipos de critérios microbiológicos preestabelecidos:

- Leis e Regulamentos – São critérios microbiológicos existentes em legislações e regulamentos comunitários. O seu cumprimento é obrigatório, sujeito a monitorização por parte dos organismos oficiais e a falha no cumprimento pode levar a sanções (Santos *et al*, 2005).
- Especificações Microbiológicas – São critérios microbiológicos definidos como acordo contratual em trocas comerciais, são variáveis conforme operador,

contrato, país, etc. A falha neste acordo pode levar à rejeição do produto por parte do comprador (Santos *et al*, 2005).

- Valores Guia – São critérios microbiológicos que ajudam a indústria e restantes operadores a definir os limites aceitáveis e não aceitáveis dos seus produtos. Estes critérios microbiológicos servem de orientação para a identificação de situações que requerem uma maior atenção e monitorização, com o objetivo de garantir o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico, ou até para evidenciar a necessidade de medidas de corretivas (Santos *et al*, 2005).

## Legislação aplicável a critérios microbiológicos

O *Codex Alimentarius* foi criado em 1963, estabelecido pela Comissão do *Codex Alimentarius* em conjunto com a Food and Agriculture Organization (FAO) e a World Health Organization (WHO), para assegurar a higiene dos alimentos, consistindo num conjunto de normas alimentares, códigos de boas práticas e princípios gerais.

Em 2005 saiu o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 que define os critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios, sobretudo carnes e legumes. Este regulamento sofreu alterações/adendas pelos regulamentos (CE) n.º 1441/2007, n.º 365/2010 e n.º 1086/2011.

A legislação Portuguesa é omissa no que se refere à grande maioria dos produtos prontos a comer, existindo legislação apenas para bolos e cremes de pastelaria, leites e produtos à base de leite, entre outros.

## Valores Guia

Em 2005 foram publicados, pelo INSA, valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (Santos *et al*, 2005) (Figura 1). Estes valores guia não servem para substituir os critérios presentes nos regulamentos, mas para complementar a informação existente, nomeadamente no que diz respeito a alimentos prontos a comer. É necessário ter atenção para não se interpretarem valores guia quando existem critérios microbiológicos legais.

Alimentos prontos a comer são aqueles consumidos no mesmo estado em que são distribuídos e vendidos e que não incluem processamento pelo consumidor. Podem ser

crus, cozinhados, quentes ou aquecidos e podem ser consumidos sem mais aquecimento (NSWFA, 2009). Os alimentos são divididos em 3 grupos, conforme as suas características (tabela 8).

Microorganismo	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Microorganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$> 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$> 10^4 \leq 10^7$	$> 10^7$	NA
Leveduras	1* e 2	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	3	$\leq 10^3$	$> 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
Bolores	1* e 2	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	#
	3	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3$	#
Coliformes totais	1	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	NA
	2	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
<i>E. coli</i>	1, 2	$\leq 10$	NA	$\geq 10$	NA
	3	$\leq 10$	$> 10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria spp.</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito redutores	1, 2 e 3	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
<b>Patogénios</b>					
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1, 2 e 3	$\geq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Clostridium perfringens</i>	1, 2 e 3	$< 10$	$\geq 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $< 10^2$ #	-	$\geq 10^2$
<i>Campylobacter spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g

- \* - Aplicável em produtos conservados no frigorífico
- # - Equacionado caso a caso
- NA - Não aplicável

Figura 1 - Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimento cozinhados prontos a comer (Fonte: Santos et al, 2005).

Os termos usados para expressar a qualidade microbiológica dos alimentos cozinhados prontos a comer são:

- Satisfatório – os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica.
- Aceitável – os resultados analíticos indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos.
- Não satisfatório – os resultados indicam que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos.



- Inaceitável/potencialmente perigoso – os resultados analíticos indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde. Este resultado deve ser comunicado imediatamente à unidade onde foi detetado, para que sejam tomadas as medidas que permitam corrigir a situação.

**Tabela 8** - Grupos de alimentos prontos a comer (Fonte: Santos et al, 2005).

Grupo	Produto	Exemplos
<b>Grupo 1</b>	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada.	Feijoada Pizza Bacalhau à Brás com salsa previamente processada Salada de batata com maionese industrial Pastéis de bacalhau/Croquetes/ Rissóis Sandes de carne assada Sandes de pâté de atum (maionese industrial) Omeleta de Queijo /fiambre Mousse de chocolate instantânea Bolo de chocolate Arroz doce com ou sem canela Gelatinas Salada de fruta/fruta laminada em calda
<b>Grupo 2</b>	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria	Salada de batata com tomate/alface Salada de feijão frade com atum, salsa e cebola picada ou molho vinagrete Prato de peixe/carne/ovos adicionado de salada de vegetais ou frutos Bacalhau à Brás c/ salsa crua e/ou azeitonas Sandes com carne assada e alface Sandes de fiambre, queijo ou enchidos Mousse de chocolate Pudins com fruta ao natural Salada de fruta em calda adicionada de fruta ao natural
<b>Grupo 3</b>	Saladas/ Vegetais/Frutos crus	Alface Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada Morangos

# Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas quer aos alimentos, superfícies e manipuladores quer aos diferentes tipos de águas, são essenciais para o controlo e a qualidade, de forma a evitar danos na saúde do ser humano. Os testes de avaliação microbiana são essenciais para verificar as Boas Práticas de Fabricação e as Boas Prática de Higiene. Qualquer falha na qualidade das matérias-primas, na manutenção dos equipamentos e dos locais, na higiene do pessoal, na eficácia dos tratamentos térmicos ou nas condições de armazenagem, traduz-se inevitavelmente num aumento da carga microbiana (Lacasse, 1995). Do ponto de vista industrial, a análise microbiológica pode ser utilizada para estimar a vida de prateleira do produto, para avaliar a qualidade da matéria-prima e para determinar a via de contaminação nas linhas de processamento (Mossel *et al.*, 1995).

## Microrganismos Indicadores

A presença de microrganismos patogénicos na água e nos alimentos é esporádica e errática, e os seus níveis são baixos. Devido a questões relacionadas com a complexidade, a sensibilidade da deteção, o custo e a rapidez na obtenção de resultados, a análise microbiológica de rotina da água e dos alimentos não inclui a deteção de muitos microrganismos patogénicos. No entanto, a água e os alimentos para serem seguros têm que estar livres de microrganismos patogénicos.

Nas águas o teste para patogénicos específicos é geralmente limitado à avaliação da qualidade da água bruta como base para a identificação de metas de desempenho e validação, onde a monitorização é usada para determinar se um tratamento ou outro processo é eficaz na remoção de um organismo alvo. O teste microbiano incluído na verificação, na monitorização operacional e na vigilância geralmente está limitado aos testes para microrganismos indicadores (WHO, 2003).

Nos alimentos, não sendo praticável, em análises de rotinas fazer a pesquisa de todos os patogénicos, generalizou-se a utilização de grupos ou espécies de microrganismos que são mais facilmente determinados, e cuja presença nos alimentos, entre determinados limites numéricos, indica exposição a condições que podem introduzir e/ou permitir a proliferação de microrganismos infecciosos ou toxigénicos.

Um microrganismo indicador de contaminação, deve apresentar características uniformes e estáveis nos diferentes tipos de águas e alimentos e, possuir propriedades específicas de modo a identificar corretamente o grupo a que pertence. Não deve ser

patogénico e deve ser facilmente detetado por métodos de cultura simples, baratos e de elevada sensibilidade, de modo a detetar concentrações pequenas do microrganismo indicador. Deve resistir às condições ambientais e processos de desinfeção e não representar um perigo para a saúde humana. Deve sobreviver de forma semelhante ou melhor que o agente patogénico, e por um período de tempo superior. Deve estar presente sempre que o microrganismo patogénico esteja presente, e ausente sempre que não seja detetada contaminação. As concentrações do microrganismo indicador devem ser superiores e correlacionarem-se com as do patogénico e com o grau de poluição/contaminação (Prescott *et al.*, 1996; Pelczar *et al.*, 1997).

A contaminação fecal é um fator importante na avaliação da qualidade da água e dos alimentos, devido aos riscos que acarreta para a saúde humana, estando correlacionada com um risco de presença de microrganismos patogénicos. Assim, a qualidade sanitária dos alimentos e das águas pode ser determinada procurando-se microrganismos indicadores de contaminação fecal. Para além das características já mencionadas anteriormente, estes microrganismos indicadores devem estar universalmente presentes no intestino e em fezes de seres humanos e de animais de sangue quente, em grande número (Gauthier e Archibald, 2001; WHO, 2003). Os indicadores de contaminação fecal mais utilizados para controlar a qualidade de géneros alimentícios são as bactérias coliformes totais, coliformes fecais (ou termotolerantes), e ainda especificamente os seguintes grupos taxonómicos: *Escherichia coli* (coliforme fecal), *Enterobacteriaceae* (inclui coliformes totais e termotolerantes) e bactérias de Gram positivo pertencentes ao género *Enterococcus* e clostrídios sulfito-redutores. Nas águas os indicadores de contaminação fecal pertencem ao grupo dos coliformes fecais e não fecais, o grupo dos *Enterococcus* e *Clostridium perfringens*.

## Parâmetros Microbiológicos

### 1. Microrganismos totais/ deterioradores

#### 1.1. Microrganismos heterotróficos

Permite a deteção de um amplo espectro de microrganismos heterotróficos, com base na capacidade dos organismos de crescer em meios de crescimento ricos, sem agentes inibitórios ou seletivos, durante um período de incubação específico e a uma temperatura definida.

A avaliação do número de microrganismos a 22°C (microrganismos que estão presentes naturalmente na água) e a 36°C (microrganismos com origem no ser humano ou em animais de sangue quente), não é um indicador específico de poluição fecal, mas sim de enriquecimento por matéria orgânica facilmente degradável (Ferreira e Sousa, 1998).

As contagens de colónias são úteis para a avaliação do estado da água e dos processos de tratamento utilizados, por exemplo, nas ETARs, permitindo assim, avaliar a eficiência dos tratamentos a que as águas estão sujeitas.

Nos alimentos a contagem de microrganismos a 30°C reflete a qualidade higiénica do produto analisado, indicando para além das condições higiénicas da matéria-prima, a forma como os alimentos foram manipulados durante a sua preparação. Contudo, uma contagem total baixa não assegura que um alimento esteja isento de patogénicos ou toxinas, nem uma contagem total alta significa, inevitavelmente, a presença de bactérias patogénicas.

## **1.2. Bolores e leveduras**

Os bolores são fungos filamentosos, multicelulares, que podem estar presentes no solo, no ar, na água e em matéria-orgânica em decomposição. As leveduras são fungos não filamentosos, normalmente disseminados por insetos vetores, pelo vento e pelas correntes aéreas (Siqueira, 1995). Apesar da maioria dos bolores e leveduras serem aeróbios obrigatórios, a sua necessidade ácido/alcalina é bastante abrangente, podendo crescer entre pH 2 até pH acima de 9. A sua temperatura de crescimento varia entre os 10 e os 35°C, com algumas espécies capazes de crescer abaixo ou acima desta escala. As necessidades nutricionais dos bolores são bastante baixas, crescem com atividade de água de 0,85 ou menos, no entanto, as leveduras precisam de atividade da água superior.

Tanto os bolores como as leveduras causam vários níveis de deterioração e decomposição dos alimentos. Podem invadir e crescer em qualquer tipo de alimento, incluindo os processados. A sua deteção depende do tipo de alimento, do organismo envolvido e do grau de contaminação; a contaminação do alimento pode ser ligeiramente visível, muito visível ou causar decomposição total do alimento. Produzem por vezes sabores anormais e odores. A contaminação de alimentos por bolores e leveduras pode resultar em perdas económicas substanciais quer para o produtor, como para o processador ou até mesmo para o consumidor. Vários bolores presentes na contaminação dos alimentos, e algumas leveduras, podem também representar perigo

para a saúde humana, devido à sua capacidade de produzirem toxinas, designadas de micotoxina, desencadeando reações alérgicas ou causando infeções. A maioria das micotoxinas são compostos estáveis que não são destruídos durante o processamento do alimento. Apesar da generalidade dos organismos não sobreviverem à preparação do alimento, a toxina produzida continuará presente.

Esta flora microbiana é considerada um indicador do índice de higiene.

## 2. Microrganismos Indicadores de Contaminação

### 2.1. Família *Enterobacteriaceae*

Esta família é constituída por bactérias de Gram negativo em forma de bastonete, aeróbias ou anaeróbias facultativas. São fermentadoras da glucose, produtoras de catalase e citocromo-oxidase negativo (Ferreira e Sousa, 2000). Incluem-se diversas espécies muito importantes para o homem, incluindo muitos indígenas do trato intestinal humano e animal, como a *Escherichia coli*, e outros habitantes do solo e da água que podem estar envolvidos em processos patogénicos, por exemplo a *Salmonella* e a *Yersinia*. Algumas destas bactérias podem provocar problemas graves na saúde do Homem, como septicemias, infeções do trato urinário, meningite, gastroenterites, entre outras patologias (Brenner *et al*, 2005).

As *Enterobacteriaceae* são frequentemente utilizadas em microbiologia alimentar como organismos indicadores. A sua presença em alimentos processados indica tratamento inadequado ou contaminação ambiental pós processo pode, ainda, ajudar a indicar a extensão da contaminação fecal (Mossel, 1982).

#### 2.1.1. Coliformes

Os coliformes são um grupo de espécies que apresentam um conjunto de características morfológicas e fisiológicas, avaliadas pelo cultivo em meios de cultura seletivos. É constituído por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, habitantes do aparelho intestinal do homem e de outros animais homeotérmicos. São bactérias de Gram negativo, em forma de bastonete e anaeróbias facultativas. São oxidase-negativas, não formadoras de esporos, que fermentam a lactose, para além da glucose, com produção de gás e ácido, quando incubadas a 36°C durante 48 horas, num meio

de cultura com sais biliares e detergentes, pois possuem a enzima  $\beta$ -D-galactosidase, que quebra as ligações  $\beta$ -1,4 da lactose (Pelczar, *et al.*, 1997; WHO, 2003;)

Algumas bactérias coliformes como a *Escherichia coli* fazem parte da flora normal do intestino do Homem e dos animais de sangue quente, por este motivo estas bactérias são consideradas indicadores de contaminação fecal. No entanto, apesar de serem fáceis de detetar, a sua associação com a contaminação fecal não é tão linear, isto porque estas bactérias têm sido encontradas em outros ambientes. Por este motivo, nos alimentos, este parâmetro serve como indicador das condições sanitárias do local de processamento do alimento e, ainda, como indicador da qualidade. Em alimentos cozinhados, a presença de bactérias coliformes indica sempre um mau manuseamento do produto ou higiene inadequada por parte dos manipuladores. Deste modo, torna-se de especial importância a análise deste parâmetro nos alimentos. Nas águas a análise de coliformes é importante, uma vez que estes funcionam como um indicador de possíveis falhas no tratamento ou nos sistemas de distribuição.

Os coliformes fecais (ou coliformes termotolerantes) são tradicionalmente definidos como coliformes que fermentam a lactose à temperatura de 44,5°C num meio contendo sais biliares. Na maioria das águas, o género predominante é *Escherichia*, mas alguns tipos de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* também são termotolerantes. Como resultado, este grupo é considerado como um índice de poluição fecal menos confiável, mas aceitável.

### **2.1.2. *Escherichia coli***

A *E. coli* é uma bactéria indígena do trato intestinal do Homem e dos animais de sangue quente, funcionando como um indicador de contaminação fecal, que pode ser causada devido ao mau manuseamento do alimento ou às más práticas de higiene por parte dos manipuladores. A maioria das estirpes de *E. coli* não são patogénicas e residem inofensivamente no cólon. No entanto, certos serotipos desempenham um papel nas doenças intestinais e extraintestinais, como as infeções do trato urinário (Brenner *et al.*, 2005).

A *E. coli* pertence à família das *Enterobacteriaceae* e ao grupo dos coliformes termotolerantes e é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete. É uma bactéria mesófila que pode multiplicar-se a temperaturas entre os 8 e os 48°C e é anaeróbia facultativa (Neidhardt *et al.*, 1990). É fermentadora da lactose, oxidase

negativa e catalase positiva. As células não utilizam o citrato, não produzem H<sub>2</sub>S ou lípases, e não hidrolisam a ureia (Brenner *et al*, 2005).

## 2.2. Enterococos intestinais

Os enterococos intestinais são um subgrupo dos estreptococos fecais, compreendendo espécies do género *Streptococcus*. Este subgrupo é composto pelas espécies *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae*, e veio substituir o parâmetro indicador Estreptococos fecais. Os enterococos intestinais são estreptococos fecais que crescem a 45°C, na presença de 40% de sais biliares e em concentrações de sódio de 6,5%, que são inibidores dos organismos coliformes e da maior parte dos microrganismos (Ferreira e Sousa, 1998). São microrganismos que fazem parte da flora normal do trato intestinal do Homem e de outros animais de sangue quente, sendo considerados indicadores de contaminação fecal, quando analisados em águas. No entanto, por vezes os enterococos encontrados na água podem ter origem em outros habitats, como o solo, na ausência de poluição fecal direta. Para além de indicadores de poluição fecal, são também utilizados para testar a qualidade da água após reparação ou intervenção no sistema de distribuição. Uma vez que, são mais resistentes a processos de desinfeção do que a *E. coli* e os coliformes, são utilizados como indicadores adicionais da eficácia dos tratamentos a que as águas são sujeitas.

Os enterococos intestinais são bactérias de Gram positivo e ocorrem isoladamente, em pares ou em cadeias curtas. São anaeróbias facultativas, relativamente tolerantes ao cloreto de sódio e a pH alcalino, catalase negativas e a temperatura ótima de crescimento é de 35 a 37°C (Prescott *et al.*, 1996).

## 2.3. Bactérias Sulfito-redutoras e Esporos de Anaeróbios sulfito-redutores

As bactérias sulfito-redutoras são microrganismos anaeróbios que produzem esporos muito resistentes a condições desfavoráveis (temperaturas e pH extremos, radiação UV). Estas bactérias não são exclusivamente de origem fecal, ao contrário do *Clostridium perfringens*.

Os esporos de bactérias sulfito-redutoras estão amplamente espalhados no ambiente, presentes na matéria fecal dos humanos e dos animais, em águas residuais e nos solos (Sneath, *et al*). Ao contrário da *E. coli* e de outros organismos coliformes, os esporos destes microrganismos sobrevivem na água por longos períodos, e são resistentes à

ação do cloro, mesmo nas concentrações utilizadas para o tratamento das águas. Assim, estas bactérias podem funcionar como indicadores de contaminação remota ou intermitente. Os esporos destes organismos são mais pequenos do que os cistos dos protozoários e, por isso, são indicadores úteis da eficácia do processo de filtração no tratamento das águas.

#### **2.4. *Clostridium perfringens***

O *Clostridium perfringens* é um microrganismo que existe naturalmente na flora intestinal de 13 a 35% dos seres humanos e de outros animais homeotérmicos. Tal como a *E. coli*, o *C. perfringens* não se multiplica na maioria dos ambientes aquáticos e é um indicador altamente específico de poluição fecal. Representa cerca de 95% dos organismos anaeróbios, redutores de sulfito, presentes nas fezes e em águas residuais, em menor número do que os coliformes e enterococos intestinais (Ferreira e Sousa, 1998).

É uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete, anaeróbica obrigatória, pertencente à família *Clostridiaceae* (Lacasse, 1995; Forsythe, 2010). A sua temperatura ótima de crescimento é entre os 37 e os 45°C. A produção de enterotoxinas aliada à capacidade de produzir esporos dá origem à elevada patogenicidade deste microrganismo (Pelczar *et al.*, 1997; Sneath, *et al.*) Nos alimentos pode ser encontrado em carne crua, sopa desidratada, vegetais, especiarias e em alimentos mal cozinhados e posteriormente mal refrigerados. As células vegetativas são facilmente destruídas por cozedura, mas os esporos são muito resistentes ao calor, e a temperaturas de refrigeração e congelação. Nas águas, são indicadores de uma poluição hídrica de origem fecal, remota ou intermitente, devido aos longos períodos de permanência e às condições de sobrevivência dos seus esporos (Ferreira e Sousa, 1998).

### **3. Microrganismos Patogénicos**

#### **3.1. *Salmonella sp.***

O género *Salmonella* pertence à família das *Enterobacteriaceae* e são bacilos de Gram negativo, imóveis ou móveis por flagelos e anaeróbios facultativos. Estas bactérias multiplicam-se em meios contendo glicose, produzindo gás. De um modo geral, fermentam dulcitol, mas não a lactose, utilizam o citrato como fonte de carbono,



produzem sulfureto de hidrogénio, lisina e ornitina descarboxilase, indol e são negativos para a urease (Brenner *et al*, 2005).

A salmonelose é reconhecida como uma das principais infeções transmitidas pelo consumo de alimentos e água contaminados. O homem pode disseminar salmonelas para outros seres humanos. As pessoas doentes ou portadoras assintomáticas excretam salmonelas nas fezes e podem contaminar as mãos, que posteriormente, contaminam os alimentos (Pelczar *et al.*, 1997). A maioria das espécies são patogénicas para o ser humano, mas as características e a severidade das doenças que originam são variáveis.

São microrganismos mesófilos e têm uma temperatura ótima de multiplicação entre os 35 e os 37°C. As salmonelas não têm capacidade de se multiplicar à temperatura de refrigeração, mas são extremamente resistentes à congelação (Ray, 2005).

Tendo em consideração que a água é um dos veículos de transmissão, a presença ou ausência de *Salmonella* deve ser monitorizada. Esta bactéria encontra-se em praticamente todo o tipo de águas. As descargas do esgoto municipal, gado e animais selvagens, a poluição da agricultura e o escoamento das águas pluviais são as principais fontes destes patógenos (WHO, 2003).

### **3.2. Staphylococcus**

Os *Staphylococcus* são bactérias saprófitas da pele, podem habitar no sistema digestivo (nomeadamente no estômago e intestino grosso), no trato urinário, na mucosa nasal e oral, e na conjuntiva dos olhos. São bactérias de Gram positivo, em forma de cocos, agrupando-se caracteristicamente em cacho. São anaeróbias facultativas, produtoras da enzima catalase e produzem ácidos por degradação da glucose, em aerobiose e em anaerobiose (Sneath, *et al*). São capazes de crescer em meios com elevado teor de cloreto de sódio (10%) e a temperaturas compreendidas entre os 18° e os 40°C (Ferreira e Sousa, 2000)

São considerados indicadores de contaminação inter-humana, havendo estirpes potencialmente patogénicas. Algumas das substâncias necessárias à desinfecção da água das piscinas, como o cloro, têm uma ação irritante sobre as mucosas potenciando a virulência destas bactérias. É, por isso, um microrganismo particularmente pesquisado em águas de piscinas, não constituindo um problema grave nas águas de consumo.

Os *Staphylococcus aureus* têm como principal reservatório o Homem, por este motivo, a contaminação dos alimentos ocorre essencialmente devido à inadequada manipulação destes e às más práticas de higiene. Assim, quando presente nos alimentos e principalmente em alimentos processados é um indicador de más condições sanitárias (Lacasse, 1995). Os *Staphylococcus aureus* são anaeróbios facultativos, mas que crescem melhor em meio aeróbico, são catalase-positivos, oxidase-negativos e produtores da coagulase (Pelczar *et al.*, 1997; Sneath, *et al.*). Quando em condições favoráveis produzem uma enterotoxina termorresistente responsável pela intoxicação alimentar no Homem, denominada intoxicação estafilocócica (Forsythe, 2000). Contudo, é bastante vulnerável a temperaturas elevadas e a praticamente todos os agentes de desinfeção.

### 3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* pertence à família *Pseudomonadaceae* e é uma bactéria oportunista e patogénica com elevada resistência a antibióticos (Gutiérrez *et al.*, 2007; Nicolau e Oliver, 2010). Podem causar uma diversidade de infeções, mas raramente causam doenças graves em indivíduos saudáveis, sem algum fator de predisposição. Predominantemente coloniza feridas cirúrgicas, queimaduras, o trato respiratório de pessoas já debilitadas e olhos com patologia. A partir destes pontos, podem invadir o organismo, causando lesões graves, septicémia e meningite. De qualquer forma, a importância para a saúde das *Pseudomonas aeruginosa* está relacionada com o contacto com a água e não com sua ingestão.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria aeróbia, de Gram negativo, em forma de bastonete e móvel. A sua mobilidade é assegurada por um ou vários flagelos polares, e é catalase e oxidase positiva. Tem sido considerada como um novo indicador de contaminação fecal, apesar desta bactéria não ser um habitante usual do trato gastrointestinal, é excretada por cerca de 12% da população adulta (Ferreira e Sousa, 1998). A presença desta bactéria pode ser usada como indicador generalista da higiene de um sistema de distribuição de água e da qualidade das águas engarrafadas. Nas águas engarrafadas, valores muito elevados desta bactéria, estão associados a reclamações por turvação, sabor e cheiro (WHO, 2008)

### 3.4. *Legionella sp.*

O género *Legionella* pertence à família *Legionellaceae* e é constituído por bactérias de Gram negativo, em forma de bastonete, estritamente aeróbias e móveis (Ferreira e Sousa, 2000). São catalase positivas, oxidase negativa, não redutoras de nitratos e urease negativas. As legionelas são nutricionalmente fastidiosas, requerem ferro e L-cisteína para crescerem (Brenner *et al*,2005). Estas bactérias fazem parte de um grupo de patogénicos que são capazes de entrar nas células humanas e de se multiplicarem, provocando múltiplas doenças e milhões de mortes em todo o mundo. São bactérias que se encontram no meio ambiente, sendo ubíquas na natureza, onde parasitam protozoários. Dentro do género *Legionella*, a bactéria *Legionella pneumophila* é a mais preocupante, uma vez que provoca a doença dos Legionários, caracterizada por uma pneumonia severa, que afeta principalmente pessoas com o sistema imunitário comprometido. A transmissão da *Legionella* ocorre através da inalação de aerossóis infetados presentes em sistemas de água artificiais como o ar condicionado, torres de arrefecimento, condensadores de evaporação e chuveiros (Fields *et al.*,2002; Buchrieser, 2011).

### 3.5. *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é a única espécie de *Listeria* com potencial patogénico para o Homem. É um patogénico intracelular, responsável pela listeriose, uma das doenças bacterianas, de origem alimentar, com maior taxa de mortalidade.

É um bacilo de Gram positivo, curto e móvel (a 25°C, mas não a 37°C) devido à presença de flagelos peritríquios, anaeróbio facultativo e não esporulado. É encontrada em água, lodo, esgoto, vegetação e nas fezes humanas e de animais (Pelczar *et al.*, 1997). Tem a capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração e tolera elevadas concentrações de NaCl (10-30%). É catalase positiva, oxidase negativa, hidrolisa a bile-escolina e é  $\beta$ -hemolítica (Sneath, *et al*).

### 3.6. *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é uma bactéria de natureza ubiqüitária, que pode ser encontrada no solo, ar, matéria em decomposição, água, poeira e alimentos. É uma bactéria que provoca intoxicações devido à ingestão de alimentos contaminados com o

microrganismo e/ou com as enterotoxinas que produziu durante o seu crescimento. A intoxicação alimentar ocorre frequentemente devido ao consumo de arroz, cozido ou frito, contaminado, mas tem sido associada a outros alimentos, como massa e batatas (Pelczar *et al.*, 1997). Pela sua natureza patogénica e capacidade de se desenvolver em diferentes alimentos, a enumeração deste microrganismo é importante nas análises alimentares.

Os *Bacillus cereus* são bactérias de Gram positivo, em forma de bacilos, pertencentes à família *Bacillaceae* e são formadores de esporos. São anaeróbios facultativos, fortemente hemolíticos, catalase positiva e oxidase negativa têm a capacidade de fermentar a glucose e a maltose (Sneath, *et al*). A temperatura mínima de crescimento é entre os 10 e os 12°C e a máxima é entre os 48 e os 50°C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre os 28 e os 35°C. Crescem numa ampla gama de pH e toleram concentrações de NaCl até 7,5%. O microrganismo tem duas formas morfológicas, a de um endósporo e a de uma célula vegetativa. Os endósporos são resistentes ao calor e a enúmeras condições ambientais.

## **III. Parte Experimental**

# Preparação e Controlo de Qualidade dos Meios de Cultura (ISO 11133:2014)

Os meios de cultura disponibilizam aos microrganismos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e multiplicação. Cada grupo de microrganismos tem necessidades nutricionais específicas e, como tal, os meios são escolhidos de modo a satisfazer essas necessidades. Um meio de cultura é uma solução aquosa dos nutrientes requeridos pelos microrganismos; contém água, uma fonte de energia e fontes de carbono, azoto, enxofre, fósforo, oxigénio, hidrogénio e vários iões metálicos. Alguns meios de cultura são ainda suplementados com sangue, soro, vitaminas, aminoácidos e nucleósidos, e outros ingredientes, de modo a permitir o crescimento de determinados grupos de microrganismos (meios enriquecidos). Outros meios, porém, são formulados para suprimir o crescimento dos microrganismos que não interessam ao fim em vista, permitindo o crescimento dos microrganismos que se desejam isolar (meios seletivos ou de enriquecimento). A incubação dos meios de cultura permite o desenvolvimento dos microrganismos que resulta na formação de colónias típicas (no caso dos meios sólidos) o que facilita a identificação dos mesmos. Neste trabalho os meios de cultura utilizados para a enumeração e identificação dos microrganismos pesquisados são de acordo com as normas de referência, para o qual o método é acreditado.

## 1. Preparação

Quase todos os meios de cultura utilizados são preparados no laboratório, através de meios de cultura desidratados. Os meios de cultura desidratados são produzidos por laboratórios comerciais, sendo fornecidos em pó ou em grânulos, e a sua preparação faz-se pela reidratação destes componentes, encontrando-se expressa toda a informação necessária no rótulo da embalagem.

Num goblé de plástico pesa-se cuidadosamente o pó, ou grânulos, relativos ao volume que pretendemos obter e dissolve-se em água destilada com a ajuda do calor, no micro-ondas, até dissolução completa e com frequente agitação. Nesta fase pode ser necessário ajustar o pH do meio para valores compatíveis com os das bactérias, que se encontra definido pelo fabricante para cada meio de cultura. No final distribui-se o meio de cultura em quantidades apropriadas, por recipientes adequados (tubos de ensaio ou frascos).

É necessário esterilizar os meios de cultura, para evitar a presença de microrganismos contaminantes. O método de esterilização utilizado depende da composição dos meios de cultura. De uma forma geral, a esterilização é feita por aplicação de calor húmido sob pressão, em autoclave, que permite temperaturas altas, um aquecimento mais rápido e uma grande penetração de calor. A esterilização dos meios de cultura faz-se por exposição ao vapor a 121°C e durante 15 minutos. Alguns meios de cultura, como o VRBL e o VRBG, não podem ser autoclavados. A sua esterilização faz-se através do seu aquecimento, no micro-ondas, deixando-se ferver o meio durante alguns minutos (dependendo da quantidade do meio de cultura). Após a esterilização, os meios de cultura que se pretendem utilizar são colocados num banho a 45°C para, posteriormente, serem colocados em placas de petri. Quando não se pretende usar o meio de cultura de imediato, este deve ser conservado ao abrigo da luz, a uma temperatura entre 0 a 5°C no período determinado pelo fabricante, evitando a sua desidratação. Todos os meios são guardados e rotulados com a identificação do meio (sigla), lote interno e o seu prazo de validade.

Os meios a fundir em micro-ondas são previamente colocados em banho maria, após serem retirados do frigorífico, evitando o sobreaquecimento e as variações térmicas abruptas. Após a fusão em micro-ondas, deixa-se repousar durante 2 min, antes de se colocar em banho maria, onde são mantidos a 46°C, para serem utilizados.

Os meios de cultura utilizados nos ensaios são os referidos nas respetivas normas para a qual o ensaio se encontra acreditado. Na tabela 9 e 10 são referidos os meios de cultura utilizados para cada análise.

**Tabela 9** - Meios de cultura usados nas análises microbiológicas dos diferentes tipos de águas.

<b>Parâmetros Microbiológicos</b>	<b>Meio de cultura</b>
<b>Microrganismos a 22 e a 36°C</b>	YEA
<b><i>Escherichia coli</i></b>	CCA
<b>Bactérias coliformes</b>	CCA
<b>Enterococos intestinais</b>	SB
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	CN
<b>Estafilococos</b>	MSA
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	m-CP
<b>Esporos de anaeróbios sulfito-redutores</b>	TSC
<b><i>Legionella</i></b>	GVPC

**Tabela 10** - Meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas dos alimentos, dos manipuladores e superfícies.

<b>Ensaio</b>	<b>Meio de cultura</b>
<b>Microrganismos a 30°C</b>	PCA
<b><i>Escherichia coli</i></b>	TBX
<b>Bactérias coliformes</b>	VRBL
<b><i>Enterobactereaceae</i></b>	VRBG
<b>Estafilococos Coagulase +</b>	BP
<b>Bactérias Sulfito redutoras</b>	TSC
<b>Bolores e Leveduras</b>	DRBC
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	MYP
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	OCLA
<b><i>Salmonella</i></b>	APT
	RVS
	MKTTn
	XLD
	BG

## 2. Controlo de Qualidade

Os meios de cultura desidratados são armazenados em local fresco, seco e ao abrigo da luz e utilizam-se primeiro os que têm prazo de validade mais curto (first in-first-out). Sempre que é aberto um frasco de meio de cultura desidratado é registada a data de início de uso. Quando se preparam meios de cultura, a água utilizada na preparação é avaliada. É verificada e registada a condutividade (requisito: até 25µS/cm a 25°C) e a contaminação microbiana (requisito < 10<sup>2</sup> UFC/ mL). A contaminação microbiana é avaliada segundo a ISO 6222 (incubação a 22±1°C por 68±4h).

Na esterilização do meio, quando aplicável, é feito o controlo da temperatura medida no interior do autoclave e o tempo de esterilização para cada lote preparado, e é registado no registo do controlo dos meios de cultura. Se as temperaturas não forem cumpridas, entre os 118°C e os 124°C, o meio é rejeitado.

Após a preparação do meio de cultura todos os dados relativos ao meio de cultura, nomeadamente a designação, o fabricante, lote de fabricante, data de preparação, data de validade, massa, volume, pH, cor, consistência, controlos de esterilidade,



seletividade, especificidade, produtividade, lote interno, validade e o técnico responsável.

## Análises Microbiológicas

Os métodos de ensaio utilizados, são métodos normalizados, isto é, que seguem uma norma, ou documento normativo equivalente, elaborado por um organismo de normalização ou por um organismo setorial integrando representantes do setor técnico em questão. Estes métodos são devidamente validados, estão sujeitos a atualizações periódicas e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional e internacional. Os métodos utilizados encontram-se publicados em normas internacionais.

### Métodos de Análise

#### 1. Método da diluição em placa

O método de contagem de microrganismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras, entre outros, variando-se o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação (Silva *et al.*, 2007).

Neste método as amostras são homogeneizadas, diluídas em série, em diluente apropriado e são incorporadas num meio, ou espalhadas sobre um meio. Após a incubação, todas as colónias visíveis são contadas (Jay, 1998). O objetivo das diluições é ter um número de colónias possível de contar. Este método pressupõe que todas as células são viáveis, que de facto é o que importa, pois se os microrganismos estiverem mortos num alimento não nos vão afetar, a não ser que tenham produzido esporos ou toxinas. Este método é principalmente utilizado nas análises a alimentos, manipuladores e superfícies.

##### 1.1. Técnica de Incorporação

Na técnica de incorporação uma porção da amostra (1 mL) é misturada, uniformemente, com o meio de cultura, ainda líquido, contando-se as colónias desenvolvidas após solidificação e incubação do meio.

## 1.2. Técnica de Espalhamento

Na técnica de espalhamento, a amostra (0,1 mL) é espalhada sobre a superfície de um meio de cultura solidificado e, após incubação, as colónias desenvolvidas são contadas.

## 2. Método de Filtração por Membrana

A filtração por membrana é um método analítico clássico, para análise microbiológica de águas, que enumera os microrganismos em pesquisa, numa membrana colocada à superfície de um meio de cultura, estabelecendo o número de UFC por mL de amostra analisada.

A análise consiste em filtrar um dado volume de amostra de água, através de uma membrana de nitrato de celulose (com poros de 0,45µm ou 0,22µm), sendo posteriormente colocada na superfície de meios de cultura sólidos, seletivos para o grupo de microrganismos que se pretende quantificar (Ferreira e Sousa, 1998). É necessário cuidado ao colocar a membrana, evitando a formação de bolhas de ar, de forma a que toda a área de filtração esteja em contacto com o meio de cultura. Após a incubação à temperatura adequada, as colónias típicas são contadas e procede-se às respetivas provas de confirmação. É feita uma avaliação de reações típicas dos microrganismos através de testes bioquímicos, serológicos e enzimáticos, e também a coloração de Gram (Bancroft *et al.*, 1989). Este método é adequado para analisar grandes quantidades de água com baixa turbidez (Nollet e Gelder, 2013).

# Análises Microbiológicas às águas

Durante o estágio foram analisadas diferentes amostras de água, desde águas para consumo humano, águas provenientes de piscinas e spas, águas termais e águas balneares.

Após a colheita, as amostras devem ser analisadas o mais rápido possível, no período de:

- 12 a 18 horas para microrganismos a 36°C e 22°C, coliformes, enterococos intestinais, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp.*
- 24 a 72 horas – Bactérias sulfito reductoras e *Legionella sp.*

Caso não seja possível analisar mal chegam ao laboratório, devem ser armazenadas a uma temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Os microrganismos analisados para cada tipo de água, regra geral, são os já anteriormente referidos nas diferentes legislações. Contudo, o cliente também pode escolher o que pretende que seja analisado na sua amostra, dependendo do seu objetivo.

## 1. Enumeração de Microrganismos a $22^{\circ}\text{C}$ e a $36^{\circ}\text{C}$ (ISO 6222:1999)

O meio de cultura utilizado para a contagem de microrganismos na água é o YEA, recomendado pela norma ISO 6222:1999. Este meio é altamente nutritivo contendo extrato de levedura como fonte de vitaminas.

### 1.1. Procedimento

Agita-se a amostra e pipeta-se 1 mL da amostra para a placa de petri. Adiciona-se o meio de cultura YEA e mistura-se o meio com o inóculo, através de movimentos rotativos. Após solidificação do meio, as placas são incubadas em aerobiose a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $21\pm 3\text{h}$  (para águas de piscinas e termas) ou  $44\pm 4\text{h}$  (para ACH) e a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $68\pm 4$  horas. Após o tempo de incubação contam-se todas as colónias presentes no meio. O resultado é expresso em UFC/ ml.

## 2. Deteção e enumeração de *Escherichia coli* e bactérias coliformes (ISO 9308-1:2014)

O meio de cultura utilizado neste procedimento, o CCA, possui dois substratos cromogénicos hidrolisáveis que permitem a deteção simultânea de enzimas específicas, que clivam o substrato cromogénico, libertando o cromogénio. A  $\beta$ -D-galactosidase cliva os substratos *Salmon-Gal* (6-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) e o IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) originando colónias de cor rosa a vermelha, características dos coliformes. A  $\beta$ -D-glucuronidase cliva o *Salmon-Gal* e o substrato *X-glucuronide* (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronide) originando colónias de cor azul escuro a violeta, características da *E. coli*. O crescimento de bactérias de Gram positivo é inibido pelo *Tergitol* existente no meio de cultura.

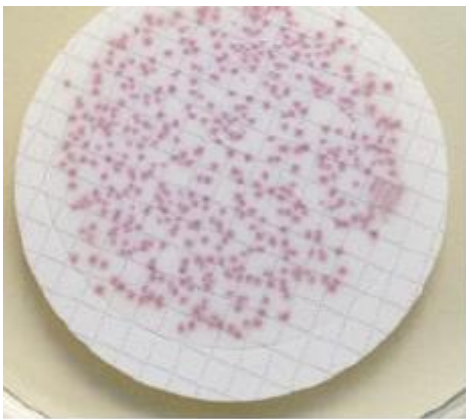
## 2.1. Procedimento

As amostras são homogeneizadas e é filtrado o volume de amostra adequado. Após a filtração a membrana filtrante é colocada numa placa, contendo meio sólido seletivo CCA. As placas são incubadas em aerobiose a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $21\pm 3$  horas e, no final, procede-se à leitura das placas.

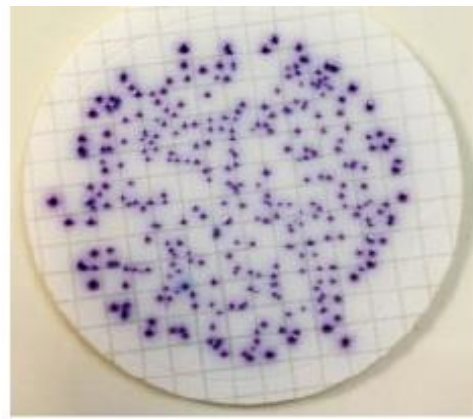
As colónias que apresentam uma coloração de rosa a vermelho, são  $\beta$ -galactosidase positivas, representando os coliformes (Figuras 2 e 4); e as colónias que apresentam uma coloração de azul-escuro a violeta, são  $\beta$ -glucuronidase positivas, representando a *Escherichia coli* (Figura 3)

Para evitar falsos positivos, as colónias com coloração rosa a vermelho são confirmadas como oxidase-negativas, através do teste da oxidase. Repicam-se todas ou, pelo menos, 10 colónias suspeitas para meio de cultura PCA e incubam-se as placas a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $20\pm 3$ h. Por fim, faz-se o teste da oxidase.

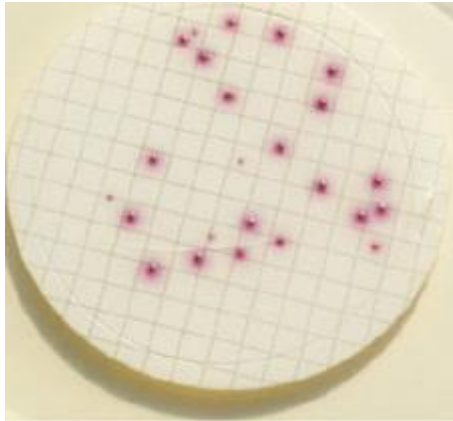
Consideram-se como coliformes todas as colónias de rosa a vermelho oxidase-negativa e de azul-escuro a violeta, e consideram-se como *Escherichia coli* todas as colónias de azul-escuro a violeta (Langue *et al.*, 2013).



**Figura 2** – Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura CCA (Fonte: Langue *et al.*, 2013).



**Figura 3**- Aspeto típico de colónias de *E. coli* no meio de cultura CCA (Fonte: Langue *et al.*, 2013).



**Figura 4** - Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura CCA (Fonte: Languette *et al.*, 2013).

### 2.1.1. Teste de Oxidase

Os citocromos, na parte terminal da cadeia respiratória, estão envolvidos na transferência de eletrões para o oxigénio. Os organismos que contêm citocromos produzem uma enzima oxidase intracelular. Esta enzima oxidase catalisa a oxidação do citocromo c (Tortora *et al.*, 2016).

O objetivo deste teste é identificar se as bactérias em estudo têm, na cadeia respiratória, o citocromo oxidase. Quando presente, a citocromo c oxidase oxida a fenilenodiamina, presente no reagente oxidase, provocando uma alteração de cor para roxo (Steel, 1961). O reagente teste, *N, N, N', N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* funciona como um aceitador artificial de eletrões para a enzima oxidase.

As bactérias que são oxidase positiva contêm o citocromo c oxidase, e podem usar o oxigénio, como um aceitador final de eletrões na respiração.

Num frasco coberto com papel de alumínio, pesa-se 0,05 gramas de *N, N, N', N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* e dissolve-se em 5 mL de água. Esta solução deve ser utilizada o mais rapidamente possível de forma a evitar a sua oxidação. Num papel de filtro colocam-se 2 a 3 gotas de reagente da oxidase. Com a ajuda de uma ansa retira-se um bocado da colónia em estudo e coloca-se em contacto com o papel de filtro, contendo o reagente da oxidase, e aguarda-se reação. A reação de oxidase é positiva quando ocorre a produção de cor azul-púrpura escuro em, no máximo, 10 segundos. Outras reações, nomeadamente o aparecimento de uma coloração púrpura ao fim de 30 a 60 segundos, é considerado um resultado negativo (Figura 5).

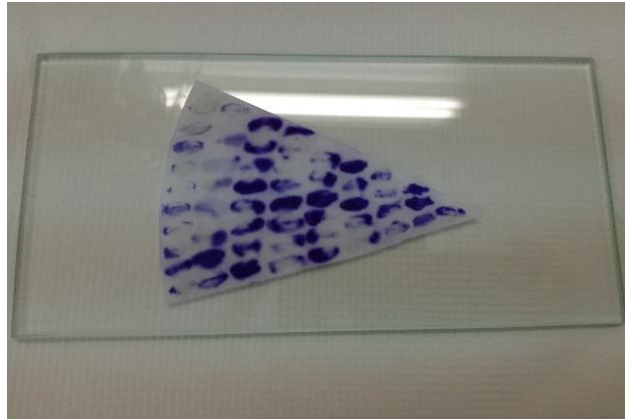


Figura 5 - Exemplo de um teste de oxidase (Fonte: Autor).

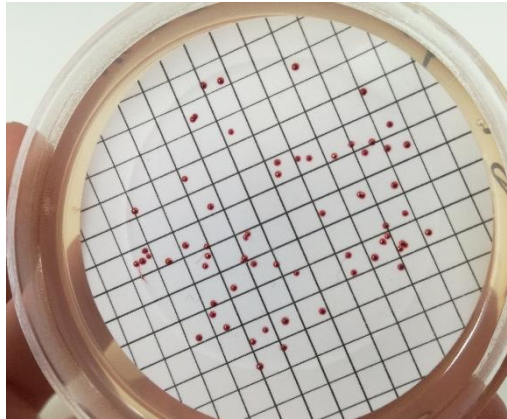
### 3. Enumeração e deteção de Enterococos intestinais (ISO 7899-2:2000)

O meio de cultura utilizado neste procedimento, *Slanetz and Bartley*, é baseado na capacidade que os Enterococos intestinais têm para reduzir o TTC (2,3,5-trifeniltetrazolium chloride – corante incolor) produzindo a formazina (corante vermelho). Esta reação é observada através da coloração das colónias (que varia entre o rosa, vermelho e castanho), uma vez que a formazina localiza-se no interior das células, fazendo com que estas adquiram a coloração específica. A azida de sódio, presente na constituição do meio, é o agente seletivo e tem como objetivo inibir o crescimento das bactérias de Gram negativo e de *Staphylococcus*.

#### 3.1. Procedimento

As amostras são inicialmente homogeneizadas e é filtrado o volume de amostra adequado. Após a filtração a membrana filtrante é colocada numa placa contendo meio sólido seletivo SB. As placas são incubadas em aerobiose a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $44\pm 4$  horas. Após o tempo de incubação procede-se à leitura das placas.

Consideram-se como colónias suspeitas de Enterococos intestinais, as que apresentarem cor vinosa (cor de vinho tinto) vermelha, castanha e rosa (Figura 6).

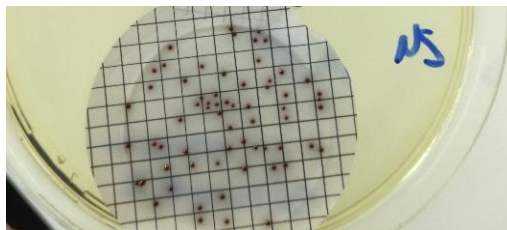


**Figura 6** - Aspeto típico de colónias suspeitas de Enterococos Intestinais no meio de cultura SB (Fonte: Autor).

Procede-se à confirmação das colónias suspeitas transferindo-se a membrana para uma placa, com meio de cultura de *Bile Esculina Azide Agar* (BEA) pré-aquecido a 44°C. As placas são incubadas em aerobiose a 44±0,5°C durante 2 horas.

Os enterococos intestinais no meio de cultura BEA hidrolisam a esculina. Os compostos formados pela hidrólise da esculina reagem com os iões de ferro, provenientes do citrato férrico de amónio (contido no meio), originando uma coloração negra.

Consideram-se como enterococos intestinais as colónias que após o teste de confirmação apresentem cor negra (Figura 7).



**Figura 7** – Aspeto típico de colónias de enterococos intestinais no meio de cultura BEA (Fonte: Autor).

#### 4. Deteção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* (ISO 16266: 2006)

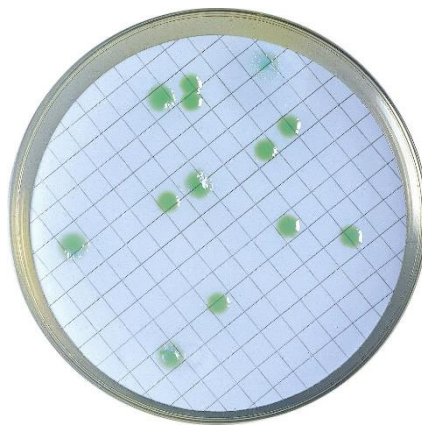
O meio de cultura utilizado neste procedimento é o *CN Pseudomonas Agar*, suplementado com glicerol, que funciona como uma fonte de energia. O princípio do meio é baseado na capacidade que os microrganismos alvo têm em produzir piocianina (pigmento azul, não fluorescente, solúvel em água e clorofórmio), estimulada pelo cloreto de magnésio e pelo sulfato de potássio. A cetrimida (composto amónio

quaternário) e o ácido nalídixico (antibiótico), presentes no meio, inibem a maior parte da microflora contaminante, incluindo outras espécies de *Pseudomonas*. Existem ainda *P. aeruginosa* que crescem neste meio, apresentando fluorescência (fluoresceína) ou cor castanho avermelhadas (piorrubina), porém estas duas características não são exclusivas de *P. aeruginosa*, pelo que este tipo de colónias carece de confirmação.

#### 4.1. Procedimento

As amostras são inicialmente homogeneizadas e é filtrado o volume de amostra adequado. A membrana filtrante é colocada numa placa com meio sólido seletivo CN. As placas são incubadas em aerobiose a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $44\pm 4$  horas. Após o tempo de incubação, procede-se à leitura das placas.

As colónias com cor azul-verde (com ou sem fluorescência) consideram-se como colónias de *Pseudomonas aeruginosa* confirmadas (Figura 8).



**Figura 8** – Aspeto típico de colónias de *Pseudomonas aeruginosa* no meio de cultura CN (Fonte: [http: pvl.pt](http://pvl.pt)).

As colónias fluorescentes com cor não azul-verde e com cor castanho-avermelhado são consideradas como colónias de *Pseudomonas aeruginosa* suspeitas. As colónias suspeitas necessitam de passar por algumas provas de confirmação. Repicam-se, para meio de cultura PCA, pelo menos 5 colónias e incuba-se a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $22\pm 2$ h. Após incubação às colónias inicialmente fluorescentes com cor não azul-verde realiza-se o teste de produção de amónia a partir de um caldo de acetamida. Consideram-se como colónias de *Pseudomonas aeruginosa* as que apresentarem reação positiva neste teste. Às colónias inicialmente de cor castanho-avermelhado realizam-se os seguintes testes: produção de amónia em acetamida, teste da oxidase (referido em 2.1.1.) e fluorescência em King B (apenas para as colónias oxidase-positiva). Consideram-se como colónias de *Pseudomonas aeruginosa* as que apresentarem reação positiva nos três testes.



#### 4.1.1. Teste de Produção de amónia em meio acetamida

Inoculam-se as colónias em caldo nutritivo de acetamida e incubam-se os tubos a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $22\pm 2\text{h}$ . Após incubação adicionam-se 1 a 2 gotas de reagente de Nessler

Uma reação positiva é caracterizada pela produção de cor que varia de amarelo a vermelho tijolo.

#### 4.1.2. Teste de Fluorescência em meio King B

Repicam-se as colónias para meio de cultura King's B e incuba-se a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias. Observam-se, diariamente, na lâmpada de UV, as colónias que se desenvolvem,

A reação é positiva quando ocorre fluorescência durante o tempo de incubação.

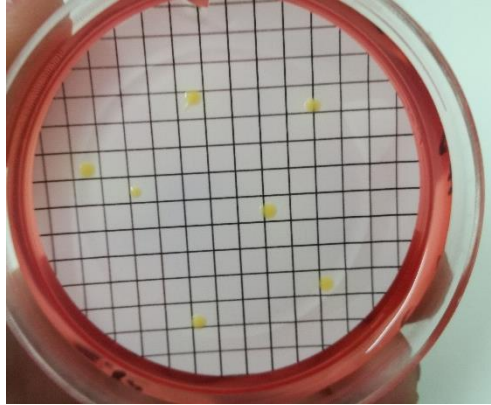
### 5. Deteção e enumeração de *Staphylococcus sp.* (Método Interno – NP 4343:1998)

Neste procedimento foi utilizado como meio de isolamento, o meio de cultura *Mannitol Salt Agar*. O funcionamento do meio baseia-se na capacidade dos estafilococos em fermentar o manitol com produção de ácido, mesmo na presença de grandes concentrações de cloreto de sódio. A degradação do manitol é detetada pela mudança de cor do meio envolvente, fruto da diminuição do pH (subprodutos ácidos), que provoca a alteração da estrutura do indicador de pH (vermelho de fenol), adquirindo a cor amarela. A presença de uma elevada concentração de sódio tem como objetivo inibir o crescimento de bactérias, exceto dos *Staphylococcus*.

#### 5.1. Procedimento

As amostras são inicialmente homogeneizadas e é filtrado o volume de amostra adequado. A membrana filtrante é colocada numa placa com meio sólido seletivo MSA. As placas são incubadas em aerobiose a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $48\pm 4$  horas. Após o tempo de incubação procede-se à leitura das placas.

São consideradas como colónias suspeitas de *Staphylococcus sp.* as que apresentarem cor branca ou amarela, com ou sem halo, eliminando as grandes e mucosas que correspondem ao género *Bacillus* (Figura 9).



**Figura 9** – Aspeto típico de colónias suspeitas de *Staphylococcus sp.* no meio de cultura MSA (Fonte: Autor).

Às colónias suspeitas de *Staphylococcus sp.* realizam-se provas de confirmação. Repicam-se 3 colónias para meio de cultura PCA e incuba-se em aerobiose a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24\pm 4$  horas. Após incubação faz-se a coloração de Gram.

### 5.1.1. Coloração de Gram

Desenvolvida por Christian Gram em 1884, a coloração de Gram é uma técnica de coloração das células bacterianas, baseada na diferente constituição química e estrutural da parede celular das bactérias. Esta técnica permite a caracterização morfológica da bactéria e a sua classificação em dois grupos segundo a sua capacidade de reter ou não a cor violeta da solução de cristal violeta sob as condições de teste (Madigan *et al.*, 1997).

O diferente comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram deve-se ao facto de os dois grupos bacterianos apresentarem parede celular química e estruturalmente distinta. Após a fixação do esfregaço pelo calor, as bactérias são coradas pelo cristal violeta. De seguida, adiciona-se o Lugol (uma solução com iodo em equilíbrio com iodeto de potássio), que atua como mordente, e em que os iões de iodo ( $\text{I}^-$ ) vão precipitar o cristal violeta formando um precipitado cristal violeta-iodo. De seguida, com a aplicação de um descorante (álcool a 95%), que origina a solubilização das membranas, o complexo cristal violeta-lugol é retido pela espessa camada de peptidoglicanos da parede celular das bactérias de Gram positivo (Gram +), que ficam

com uma cor púrpura/violeta intensa. Nas células de Gram negativo (Gram -), o complexo cristal violeta-lugol é removido, pelo que após este processo estas células ficam descoloradas. Para visualizar as bactérias Gram-negativas, adiciona-se um corante básico secundário (safranina) que atua como contrastante (Valéria, M).

Começa-se por colocar uma pequena gota de água numa lâmina de vidro. Com a ajuda de uma ansa estéril, retira-se uma pequena amostra da cultura bacteriana e espalham-se as células na gota de água, colocada na lâmina. Após a lâmina estar seca, inunda-se a lâmina com a solução Violeta Cristal, deixando a reagir por 1 minuto. Com a lâmina inclinada enxagua-se, gentilmente, durante alguns segundos com água destilada e retira-se o excesso de água, com papel absorvente. De seguida, inunda-se a lâmina com Lugol deixando atuar durante 1 minuto. Com a lâmina inclinada enxagua-se, gentilmente, durante alguns segundos com água destilada, e de seguida verte-se etanol (95%) sobre o esfregaço, nunca por um período superior a 30 segundos e até não ser visível a cor violeta. Com a lâmina inclinada enxagua-se, gentilmente, durante alguns segundos com água destilada, de forma a eliminar o etanol e, retira-se o excesso com papel absorvente. Por fim, inunda-se a lâmina com Safranina durante 10 segundos e lava-se com água destilada. Retira-se o excesso de água com papel absorvente e deixa-se secar a lâmina ao ar. No final, observa-se a lâmina ao microscópio na objetiva de imersão.

As células bacterianas que apresentem cor azul ou violeta são designadas de Gram positivo, as que por outro lado, apresentem coloração de rosa escuro a vermelho são designadas de Gram negativo.

Às colónias que são cocos de Gram positivo realizam-se os seguintes testes: catalase, tipo respiratório em M.E.V.A.G e coagulase.

### **5.1.2. Teste de Catalase**

O peróxido de hidrogénio é um produto final do metabolismo dos hidratos de carbono pela via oxidativa, sendo um composto extremamente tóxico para os microrganismos, que através da catalase o decompõem em água e oxigénio. A catalase é uma enzima que está presente na maioria das bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas e ausente nos anaeróbios estritos.

A reação é visualizada pela formação de bolhas quando se emulsiona uma cultura com peróxido de hidrogénio (Madigan *et al.*, 1997). Este teste ajuda a diferenciar o género *Staphylococcus* – catalase positiva, do género *Streptococcus* – catalase negativa.

O teste é efetuado segundo as instruções do fabricante. Coloca-se uma gota do reagente numa lâmina e, com a ajuda de uma ansa, inocula-se a colónia em estudo. A reação da catalase é positiva quando ocorre produção de bolhas de oxigénio (Figura 10).

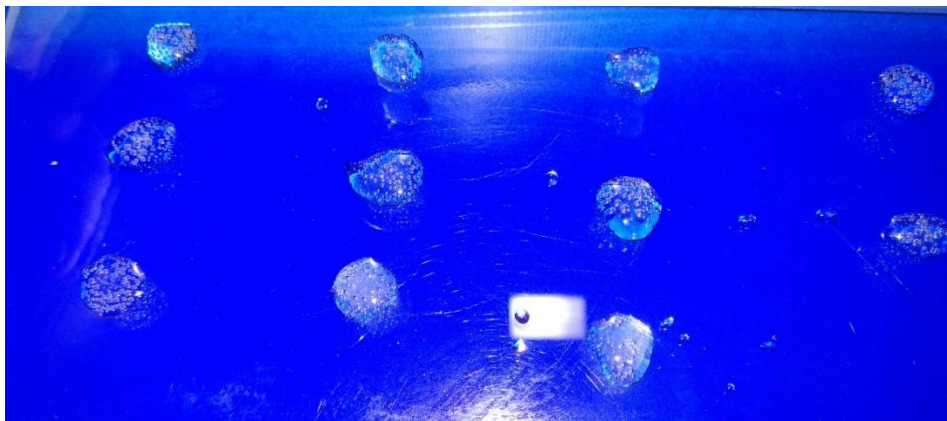
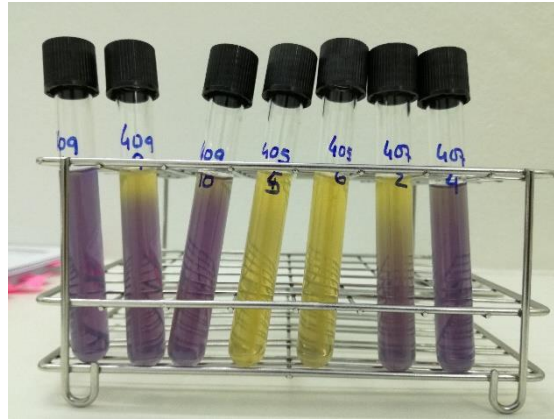


Figura 10 - Exemplo de resultados positivos no teste da catalase (Fonte: Autor).

### 5.1.3. Tipo Respiratório em MEVAG

Neste teste é averiguada a capacidade que os *Staphylococcus* possuem de crescer tanto na presença como na ausência de oxigénio. Permite diferenciar as espécies de *Staphylococcus* e *Micrococcus* com base no metabolismo oxidativo e fermentativo dos carboidratos.

Antes da utilização é necessário colocar-se os tubos num banho-maria a 44°C durante 15 min. O meio contém glucose, açúcar que é fermentado pelos estafilococos ao longo de todo o tubo (tanto na presença, como na ausência de oxigénio), provocando uma acidificação do meio, alterando a estrutura do indicador de pH (púrpura de bromocresol) levando a uma mudança de cor no meio para amarelo (Figura 11). Os *Micrococcus* como aeróbios obrigatórios que são, apenas crescem na superfície do meio.



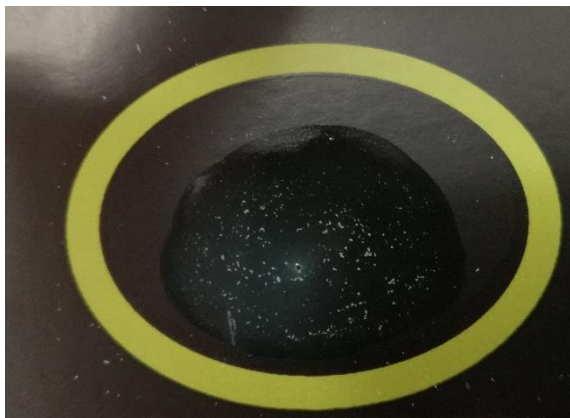
**Figura 11** – Tipo respiratório em MEVAG, exemplos de resultados positivos (tubos 405, 5 e 6) e negativos (os restantes) (Fonte: Autor).

#### 5.1.4. Teste de Coagulase

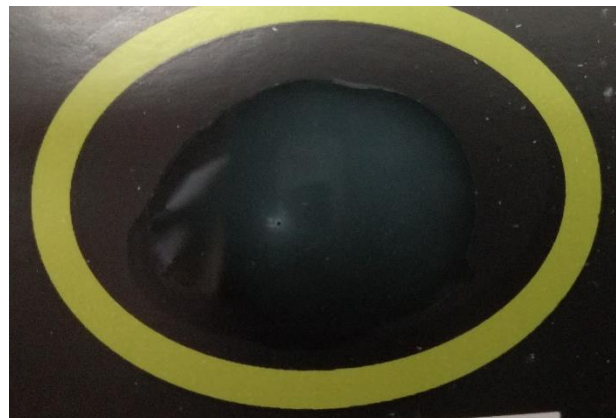
O teste da coagulase é utilizado para diferenciar *Staphylococcus aureus* dos estafilococos coagulase negativa. A coagulase é uma enzima produzida por *S. aureus* que converte o fibrinogénio (solúvel) no plasma em fibrina (insolúvel), e é um importante fator de virulência (Ryan e Ray, 2003).

É realizado um teste comercial de aglutinação que se correlaciona bem com o teste da coagulase, e é efetuado segundo as instruções do fabricante. Numa carta descartável escolhe-se dois círculos adjacentes e identificam-se. Num dos círculos, coloca-se 1 gota de R1 (reagente da coagulase) e no outro uma gota de R2 (controlo negativo). O controlo negativo serve para descartar a autoaglutinação. Inoculam-se as colónias suspeitas nos reagentes e misturam-se cuidadosamente durante 10 segundos. Por fim, dá-se um ligeiro movimento rotativo à carta durante 20 segundos e observa-se à luz, a reação.

Um resultado positivo é indicado pelo aparecimento com o reagente R1 de uma aglutinação (formação de coágulo) em 30 segundos (Figura 12). Um resultado negativo é indicado pela ausência de aglutinação com os reagentes R1 e R2 (Figura 13). A reação é ininterpretável se o reagente R2 apresentar uma aglutinação.



**Figura 12** – Observação de um resultado positivo para o teste da coagulase (Fonte: Autor).



**Figura 13** - Observação de um resultado negativo para o teste da coagulase (Fonte: Autor).

Consideram-se como *Staphylococcus sp.*, estafilococos não produtores de coagulase, todas as colónias catalase positiva, MEVAG positivo, e coagulase negativa; e como *Staphylococcus aureus*, estafilococos produtores de coagulase, todas as colónias catalase positiva, MEVAG positivo e coagulase positiva.

## 6. Deteção e enumeração de *Clostridium perfringens* (EPA 600)

No meio de cultura m-CP, o *Clostridium perfringens* não degrada o cromogénio, indoxil- $\beta$ -D glucósido, devido à falta de atividade da enzima  $\beta$ -D-glucosidase (enzima envolvida na fermentação de celobiose). As colónias características deste microrganismo devem-se à fermentação da sacarose presente no meio, reduzindo o pH, pelo que o *Brom Cresol Purple* muda de cor de roxo para amarelo. A presença de D-cicloserina e poliximina B e a incubação a uma temperatura de 44°C, inibe o crescimento de bactérias de Gram negativo e de estafilococos.

### 6.1. Procedimento

As amostras são inicialmente homogeneizadas e é filtrado o volume de amostra adequado. A membrana filtrante é colocada numa placa com meio sólido seletivo m-CP. As placas são incubadas em anaerobiose a 44,5±0,2°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação procede-se à leitura das placas. Consideram-se como colónias suspeitas de *Clostridium perfringens* as que apresentarem cor amarela opaca. A estas colónias é necessária realizar uma prova de confirmação, o teste do hidróxido de amónio.

### 6.1.1. Incubação em anaerobiose

A incubação em condições de anaerobiose é realizada com recurso a uma jarra, onde é colocada uma palete que contém componentes que se ligam quimicamente ao oxigénio, de forma rápida e completa, criando um meio livre de oxigénio (anaeróbico) e uma atmosfera de dióxido de carbono. Para controlar as condições exigidas é utilizado um indicador de anaerobiose no interior da jarra (Figura 14). O indicador são tiras impregnadas com um corante, azul de metileno, que na ausência de oxigénio é reduzido ficando incolor.



Figura 14 - Exemplo de um kit de anaerobiose (Fonte: <https://www.merckmillipore.com>).

### 6.1.2. Teste do Hidróxido de Amónio

Este teste permite avaliar a atividade da fosfatase ácida, através da exposição das colónias a Hidróxido de Amónio.

Numa hotte colocam-se cerca de 3 gotas de hidróxido de amónio, na tampa da placa de petri do meio. De seguida, coloca-se a parte inferior da placa sobre a tampa e espera-se aproximadamente 20 a 30 segundos, para que se libertem os vapores do hidróxido de amónio, e observa-se a reação.

As colónias de *Clostridium perfringens* produzem a fosfatase ácida que hidrolisa o difosfato de fenolftaleína, presente na constituição do meio de cultura, libertando a fenolftaleína. As colónias típicas desta bactéria irão apresentar uma coloração rosa escuro ou vermelha, após a exposição a vapores de hidróxido de amónio.

## 7. Detecção e enumeração de esporos de Anaeróbios Sulfito – redutores (ISO 6461-2:1986)

O meio de cultura utilizado é o TSC e é baseado na capacidade que as bactérias típicas têm para reduzir o sulfito (presente no meio) a sulfureto, reagindo posteriormente com o sal férrico presente no meio de cultura (citrato férrico) formando um precipitado negro, fazendo com que as colónias adquiram essa cor.

A deteção de esporos de anaeróbios sulfito-redutores requer um passo de destruição das células vegetativas presentes na amostra. Por isso, a amostra é colocada num banho maria a  $75\pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Antes de se proceder a este passo, coloca-se um frasco (igual ao utilizado para as amostras), com o volume adequado de água estéril, dentro do banho com um termopar. Só se começa a registar a contagem do tempo referido quando a água dentro do frasco atingir a temperatura de  $75\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

### 7.1. Procedimento

Após o passo referido anteriormente, filtram-se 50 mL da amostra numa membrana filtrante de  $0,22\mu\text{m}$ . A membrana filtrante é colocada numa placa contendo meio sólido seletivo TSC. As placas são incubadas em anaerobiose (6.1.1.) a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $44\pm 4$  horas. Após o tempo de incubação procede-se à leitura das placas.

Consideram-se como esporos de anaeróbios sulfito-redutores todas as colónias de cor negra.

## 8. Detecção de espécies de *Salmonella* (ISO 19250)

Como as células das espécies de *Salmonella* na água se encontram em baixas concentrações e “stressadas”, é necessário realizar passos de concentração e pré-enriquecimento quando se realiza a pesquisa deste microrganismo.

### 8.1. Procedimento

As amostras com volumes inferiores a 10 mL, são pré-enriquecidas em 50 mL de APT. Nas amostras com volumes superiores a 10 mL filtra-se o volume de amostra adequado e coloca-se a membrana filtrante em 50 mL de APT. Nos dois casos, a amostra é incubada a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $18\pm 2$  horas. Após incubação realiza-se um enriquecimento seletivo. Inocula-se 0,1 mL, do pré-enriquecimento num tubo com 10 mL de RVS e

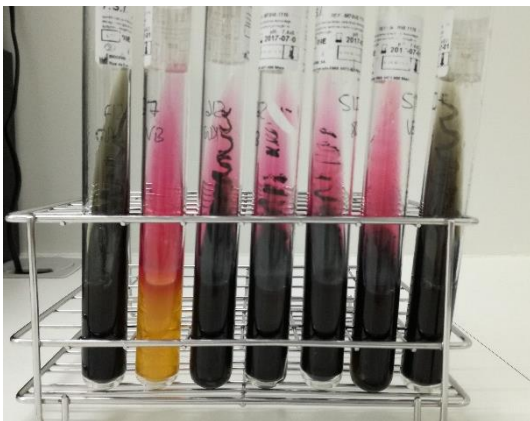


incuba-se a  $41,5\pm 1,0^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$  horas, e inocula-se 1 mL do pré-enriquecimento, em 10 mL de MKTTn e incuba-se a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$  horas. Por fim, a cultura obtida em RVS e MKTTn é isolada em meio de cultura XLD e BG. As placas são incubadas a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$  horas.

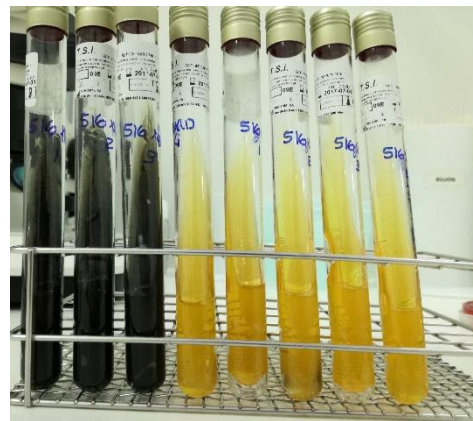
Consideram-se como suspeitas de *Salmonella* as colónias com as seguintes características:

- XLD: colónias com centro negro e zona transparente (por vezes avermelhada).
- BV: colónias com cor vermelha a rosa claro opaco com halo vermelho.

Para se realizar as provas de confirmação retira-se, pelo menos, 1 colónia típica de XLD e 1 colónia típica de BG (caso a primeira seja negativa, repicam-se outras 4 colónias típicas de cada meio). Repicam-se as colónias a confirmar para o meio de cultura PCA e incuba-se a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$ h. De seguida, repicam-se as colónias para tubos com meio de cultura TSI (picada central e isolamento na rampa) e incubam-se a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$ h. Observam-se e anotam-se os resultados obtidos (Figuras 15 e 16). Os resultados dos tubos com meio TSI são interpretados segundo a Tabela 11.



**Figura 15** - Possíveis resultados observáveis nos tubos com meio de cultura TSI (Fonte: Autor).



**Figura 16** - Possíveis resultados observáveis nos tubos com meio de cultura TSI (Fonte: Autor).

Consideram-se como *Salmonella sp.* as colónias que em TSI apresentem a rampa com cor vermelha ou sem alteração da cor do meio, formação de gás (bolhas) e fundo do tubo com cor amarela, com (em 90% dos casos) formação de  $\text{H}_2\text{S}$  (cor negra no tubo) ou no caso das *Salmonella* lactose positiva a rampa também apresenta cor amarela.

De seguida procede-se à confirmação bioquímica utilizando-se uma galeria de identificação.

**Tabela 11** – Interpretação dos possíveis resultados observáveis nos tubos com meio de cultura TSI.

<b>Aparência</b>	<b>Interpretação</b>
<b>Fundo do tubo</b>	
Amarelo (ácido)	Glucose positiva (fermentação da glucose)
Vermelho ou sem alteração de cor (alcalina)	Glucose negativa (não há fermentação dos carboidratos)
Preto	Formação de H <sub>2</sub> S
Bolhas e aberturas	Formação de gás a partir da fermentação da glucose
<b>Rampa na Superfície</b>	
Amarelo (ácido)	Lactose ou sucrose positiva (fermentação da lactose ou sucrose)
Vermelho ou sem alteração de cor	Lactose ou sucrose negativa (não há fermentação nem da lactose nem sucrose)

### 8.1.1. Galeria de Identificação de Bactérias

As galerias de identificação de bactérias são *kits* de testes bioquímicos específicos, para a identificação dos microrganismos ao nível da espécie. São constituídas por um conjunto de cúpulas com substratos liofilizados, que permitem o estudo específico do metabolismo do microrganismo que se pretende identificar. As atividades metabólicas são avaliadas por mudanças de cor após a incubação (Figura 17). Os resultados dos testes são lidos a partir da galeria com o auxílio de uma tabela fornecida pelo fabricante.

O teste foi realizado segundo as instruções do fabricante. Começa-se por preparar uma suspensão, colocando-se 1 colónia em 3 mL de solução salina. Retira-se a película da galeria, e inoculam-se 3 a 4 gotas por poço. De seguida, cobre-se os poços 1,2,3 e 9 com óleo, e tapa-se a galeria com a película que a acompanha e incuba-se a 35-37°C durante 18 a 24 horas. Em separado efetua-se o teste da oxidase (2.1.1) e anota-se o resultado. Após o período de incubação adicionam-se os seguintes reagentes:

- No poço 8: adicionam-se 2 gotas de reagente de Kovacs e lê-se o resultado após 60 segundos.
- No poço 10: adiciona-se 1 gota de VPI e uma gota de VPII e lê-se o resultado após 15 a 30 minutos.
- No poço 12: adiciona-se 1 gota de TODA e lê-se o resultado após 60 segundos.

A identificação é obtida através de um perfil numérico (Figura 18), que corresponde a uma espécie, através do programa informático de identificação.



Figura 17 – Exemplo da galeria de identificação utilizada para a identificação de *Salmonella sp.* (Fonte: Autor)

**GN-ID A+B PANEL REPORT FORM**

Lab. No: J46617 Date: 8/9/17

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Guanase	Mucopol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	Citrate	TDA	Gelatinase	Melanoide	Sorbitol	Phenolase	Sucrose	Lactose	Arajinose	Acetol	Fluorose	Salicin	Arginine		
Reaction	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Result	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1			
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1			
Sum of Positive Reactions	0			3			5			1			7														

Octal Code: 3517 Final Identification: ? *Salmonella*

Figura 18 – Exemplo do papel com o resultado das reações observáveis na galeria de identificação (Fonte: Autor).

### 8.1.2. Identificação de *Salmonella* – Latex teste

Adiciona-se 1 gota de Reagente Solução Salina num círculo do cartão de aglutinação, repica-se 1 colónia e inocula-se na gota de reagente, de forma a se obter uma suspensão homogénea. Roda-se suavemente o cartão de aglutinação durante 2 minutos e observa-se autoaglutinação. No mesmo círculo adiciona-se 1 gota do Reagente de Teste e roda-se suavemente o cartão de aglutinação durante 2 minutos. Verifica-se se ocorre aglutinação.

Um resultado positivo é caracterizado pela ocorrência de aglutinação, indicando a presença de *Salmonella sp.*

A identificação desta estirpe é dada pela galeria de identificação bioquímica e pelos testes de serologia.

## 9. Detecção e enumeração de espécies de *Legionella sp.* (ISO 11731 – 2: 2004)

O meio de cultura utilizado é o GVPC constituído por ácido  $\alpha$ -cetiglutárico, L-cisteína e pirofosfato férrico que fornecem os fatores de crescimento essenciais para uma recuperação ótima de *Legionellaceae*. O tampão ACES permite estabelecer o pH do meio a 6,9 que corresponde ao pH ótimo de crescimento. A adição de agentes antimicrobianos confere seletividade ao meio. A ciclohexamida inibe grande parte dos fungos, e a vancomicina e a polimixina inibem o crescimento da maior parte das bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. A adição de carvão ao meio é essencial para adsorver os elementos tóxicos presentes no extrato de levedura e favorecer o crescimento das legionelas.

A amostra é filtrada e após a filtração é tratada com Solução Tampão Ácida pH  $2,2 \pm 0,2$ , de forma a evitar o crescimento de outras bactérias.

### 9.1. Procedimento

Filtra-se o volume de amostra adequado (1L) e verte-se  $30 \pm 5$  mL da Solução Tampão Ácida pH  $2,2 \pm 0,2$ , no funil de filtração e aguarda-se 5 minutos. Remove-se a solução por filtração e procede-se à lavagem da membrana com  $20 \pm 5$  mL de solução salina de Page. Remove-se a solução por filtração e coloca-se a membrana filtrante (de nitrato de celulose negra, com poros de  $0,45 \mu\text{m}$ ) sobre o meio de cultura GVPC Agar. As placas são incubadas em aerobiose a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 10 dias. As placas são examinadas com recurso à lupa estereoscópica, em 3 ocasiões, em intervalos de 2 a 4 dias (2º dia, 6º dia e 10º dia).

Consideram-se como colónias suspeitas de *Legionella sp.* as que apresentem coloração branca, acinzentada, azulada, roxo, castanha, rosa, verde-lima ou vermelha, e que apresentam uma aparência semelhante a vidro estilhaçado no rebordo da colónia, quando observadas à lupa estereoscópica. Consideram-se também aquelas que possam apresentar fluorescência quando expostas à luz UV.

Para se confirmarem as colónias suspeitas, selecionam-se no mínimo 5 colónias características e repicam-se para o meio de cultura Columbia 5% Agar. As placas são incubadas a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante pelo menos 2 dias. Todas as colónias que não apresentem crescimento são consideradas como *Legionella sp.*

A identificação da estirpe de *Legionella sp.* é efetuada com recurso a um teste serológico.

### 9.1.1. Latex teste – Identificação de *Legionella*

Adiciona-se uma gota da solução tampão em 3 poços, independentes, do cartão de aglutinação. Repicam-se 3 a 4 colónias e misturam-se com o tampão até obter uma solução homogénea. Adicionam-se os reagentes Teste 1, Teste 2-15 e Teste Espécies (um em cada poço) e misturam-se gentilmente os reagentes com a solução homogénea. Segura-se o cartão e faz-se movimentos giratórios suaves durante 2 minutos. Por fim, verifica-se a ocorrência (ou ausência) de aglutinação.

O resultado é positivo se ocorrer aglutinação, indicando que a amostra tem antigénios do serogrupo em questão. O resultado é negativo se não ocorrer aglutinação. O resultado é positivo sempre que se observa uma ausência do fundo azul em relação ao reagente de controlo (reações granulares ou filamentosas).

## Cálculos e Expressão de Resultados

Após a leitura das placas e respetivas provas de confirmação (quando verificáveis), é necessário calcular o resultado do ensaio.

O resultado é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$n = (c / v_t) \times v_r$$

em que  $c$  = somatório das colónias

$v_r$  = volume de expressão do resultado,

$v_t$  = volume de amostra filtrada.

Após a identificação das colónias:  $c = (a / b) \times A$

$a$  = nº colónias identificadas

$b$  = nº de colónias a identificar

$A$  = nº de colónias totais (presuntivas)

O resultado é sempre expresso em unidades formadoras de colónias por volume de amostra inoculada/ filtrada. Na contagem de microrganismos a 22 e 36°C, quando o

número de colónias é >300, o resultado é dado como >300. Na ausência de colónias o resultado é dado como zero, no caso de leitura direta. Na filtração quando o número de colónias é > 100 o resultado é dado como > 100. Nos ensaios de presença/ ausência, o resultado é expresso como “Presente” e “Ausente”, respetivamente.

Após calculados, os resultados são exportados num relatório, para os clientes, que segundo a legislação aplicável, podem estar em conformidade ou não.

## Análises Microbiológicas aos Alimentos

Durante o estágio foram analisados diferentes tipos de alimentos, principalmente refeições e alimentos prontos a comer. As análises microbiológicas aos alimentos baseiam-se na preparação de diluições sucessivas, seguidas da técnica de incorporação ou espalhamento. As amostras devem ser analisadas, preferencialmente, nas 24 horas após a sua receção. Caso não seja possível, devem ser armazenadas do seguinte modo:

- Produtos estáveis: temperatura ambiente - entre os 18 e os 27°C;
- Congelados e ultracongelados - entre os -18 e os -15°C;
- Produtos refrigerados e ou perecíveis – a 3±2°C;

As amostras foram trabalhadas com, pelo menos, duas diluições sucessivas ou com 1 diluição em duplicado.

### 1. Preparação da Amostra

#### 1.1. Preparação da Solução-Mãe

Para se preparar a solução-mãe pesa-se, assepticamente, 10 gramas do alimento, partindo-o em bocados pequenos (no caso de alimentos sólidos), com o auxílio de uma tesoura ou faca, estéril. De seguida, juntam-se 90 mL de água peptonada tamponada, como solução diluente, num saco de homogeneização (BagFilter) e homogeneiza-se num homogeneizador, tipo stomacher, durante 2 minutos na frequência máxima.

#### 1.2. Preparação das diluições decimais

A partir da solução mãe procede-se à preparação das restantes diluições decimais. O número de diluições decimais a realizar depende da carga microbiana que é expectável o alimento ter, isto é, um alimento cru é expectável ter maior carga microbiana que um

alimento cozinhado, assim o número de diluições decimais a realizar deverá ser superior. Para se prepararem as restantes diluições decimais, colocam-se 9 mL de água peptonada tamponada para cada tubo de ensaio necessário (1 tubo = 1 diluição). A partir da solução mãe (primeira diluição) pipeta-se 1 mL para o primeiro tubo de ensaio (com 9 mL de APT) e coloca-se no vórtex 5 segundos, para homogeneizar, obtendo-se a segunda diluição. Para se preparar a terceira diluição procede-se da mesma forma, pipetando 1 mL do primeiro tubo de ensaio para o segundo tubo de ensaio e, assim, sucessivamente, para as restantes diluições. Preparadas todas as diluições e dependendo do parâmetro microbiológico a analisar, procede-se a técnica de incorporação ou de espalhamento.

## 2. Enumeração de Microrganismos a 30°C (ISO 4833:2003)

Com este parâmetro estima-se a população microbiana total do alimento, sem identificar os tipos de microrganismos presentes. A avaliação do número de microrganismos a 30°C é utilizada como um indicador do aumento do nível de contaminação microbiana nos alimentos. O meio de cultura utilizado é o *Plate Count Agar* (PCA) formulado de acordo com a ISO 4833. O meio contém digestão enzimática da caseína e extrato de levedura que fornecem carbono e nitrogénio para o crescimento de uma variedade de microrganismos, e dextrose que é a fonte de carboidratos fermentáveis.

### 2.1. Procedimento

Transfere-se 1 mL da suspensão mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri e adicionam-se 15 mL de meio de cultura líquido PCA. Após a solidificação do meio as placas são incubadas em aerobiose a 30°C durante 72 horas. No final do tempo de incubação procede-se à contagem de todas as colónias desenvolvidas.

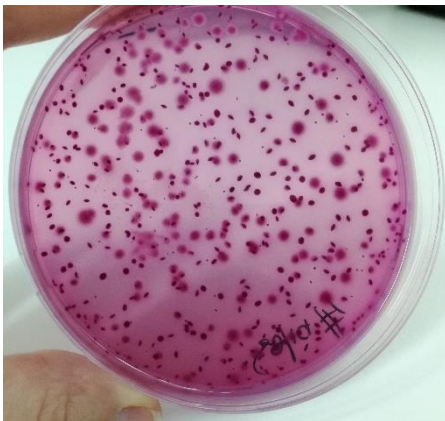
## 3. Enumeração de bactérias coliformes a 30°C (ISO 4832:2006)

No meio de cultura utilizado, VRBL, os coliformes fermentam a lactose presente no meio e reduzem o pH do meio, dando origem a colónias vermelhas-púrpuras, devido à inclusão do vermelho neutro e do violeta de cristal presentes no meio. Estas colónias, geralmente, são rodeadas por halos vermelhos-roxos de sais biliares precipitados. Os sais biliares e o violeta de cristal inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo.

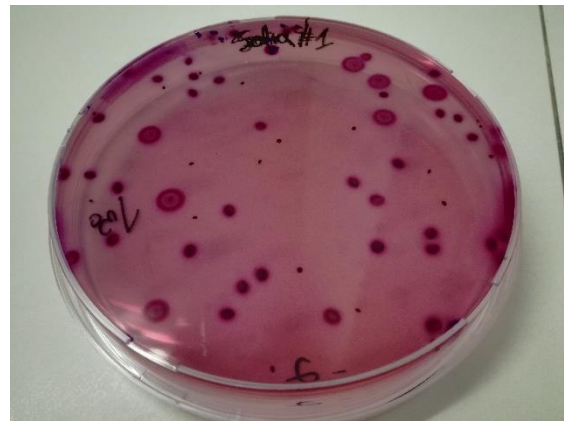
### 3.1. Procedimento

Transfere-se 1 mL da solução mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri e adicionam-se cerca de 15 mL de meio de cultura líquido VRBL. Incorpora-se o meio com o inóculo através de movimentos rotativos. Após solidificação adicionam-se, aproximadamente, mais 4 mL de meio e deixa-se solidificar. As placas são incubadas em aerobiose a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 2$  horas. Após o tempo de incubação procede-se à leitura das placas.

Selecionam-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150. As colónias com cor vermelha-violeta, por vezes rodeada por uma zona avermelhada de precipitação, são consideradas como bactérias coliformes (Figuras 19 e 20). Consideram-se como colónias suspeitas de bactérias coliformes, as atípicas (tamanho  $< 0,5$  mm) e derivadas de lacticínios que possuam outros açúcares para além da lactose.



**Figura 19-** Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura VRBL (Fonte: Autor).



**Figura 20-** Aspeto típico de colónias de coliformes no meio de cultura VRBL (Fonte: Autor).

Para confirmação, selecionam-se 5 colónias atípicas e repicam-se para brilliant green lactose bile broth. Os tubos são incubados a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 2$  horas.

Consideram-se como bactérias coliformes as colónias que mostrem formação de gás.



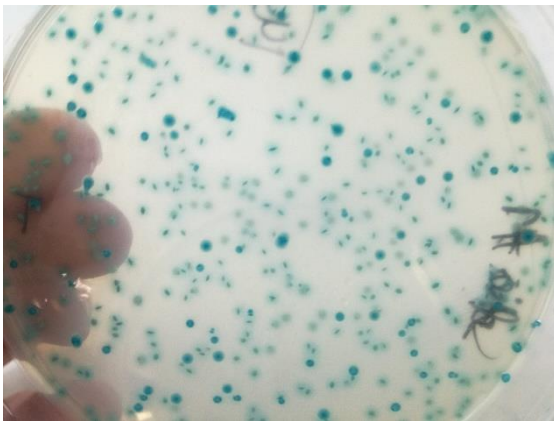
## 4. Enumeração de *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001)

A *E. coli* possui a  $\beta$ -D-glucuronidase que desdobra o substrato cromogénico BCIG (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucurónico) presente no meio de cultura TBX. As células da *E. coli* são capazes de absorver este complexo intacto e a *glucuronidase* intracelular divide a ligação entre o cromóforo e o *glucuronide*. O cromóforo lançado é colorido e acumula-se dentro das células, fazendo com que as colónias de *E. coli* apresentem cores em tons de azul/ verde.

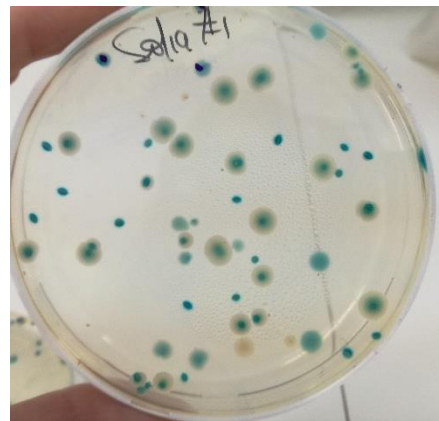
### 4.1. Procedimento

Transfere-se 1 mL da suspensão mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri. Adicionam-se cerca de 15 mL de meio de cultura líquido TBX e incorpora-se o meio com o inóculo, através de movimentos rotativos. Após solidificação do meio as placas são incubadas em aerobiose a  $44^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas. Após o período de incubação procede-se à leitura das placas. Selecionam-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150 típicas.

Consideram-se como *Escherichia coli* as colónias com cor azul/ verde (Figuras 21 e 22).



**Figura 21** - Aspeto típico de colónias de *Escherichia coli* no meio de cultura TBX (Fonte: Autor).



**Figura 22** - Aspeto típico de colónias de *Escherichia coli* no meio de cultura TBX (Fonte: Autor).

## 5. Enumeração de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2004)

As *Enterobacteriaceae* fermentam a glucose e reduzem o pH do meio, produzindo colónias com cor rosa/púrpura devido à inclusão de vermelho neutro e violeta de cristal presentes no meio. Estas colónias são, geralmente, rodeadas por halos de cor púrpura de sais biliare precipitados. Os sais violeta e biliare de cristal inibem o crescimento da flora Gram positiva.

### 5.1. Procedimento

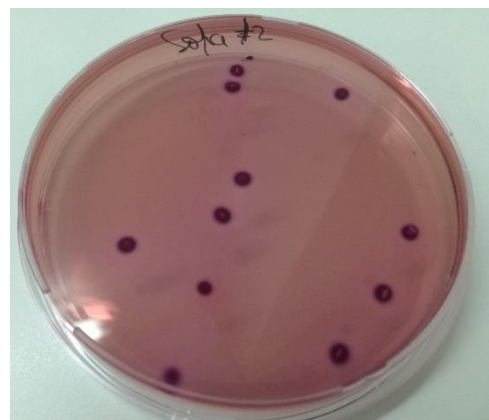
Transfere-se 1 mL da suspensão mãe e de cada diluição efetuada para a respetiva placa de petri. Adicionam-se 10 mL de meio de cultura líquido VRBG e incorpora-se o meio com o inóculo através de movimentos rotativos. Após solidificação adiciona-se uma nova camada de meio de aproximadamente 15 mL e deixa-se solidificar. Por fim, as placas são incubadas em aerobiose a 37°C durante 24±2horas.

Após o período de incubação procede-se à leitura das placas, selecionando-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150 colónias.

Consideram-se como colónias suspeitas de *Enterobacteriaceae* as de cor rosa a vermelho ou roxo, com ou sem halo de precipitação (Figuras 23 e 24). Algumas *Enterobacteriaceae* podem apresentar descoloração das suas colónias no meio. Por este motivo, quando não estão presentes colónias características, escolhem-se 5 colónias esbranquiçadas para confirmação.



**Figura 23** - Aspeto típico de colónias de *Enterobacteriaceae* no meio de cultura VRBG (Fonte: Autor),



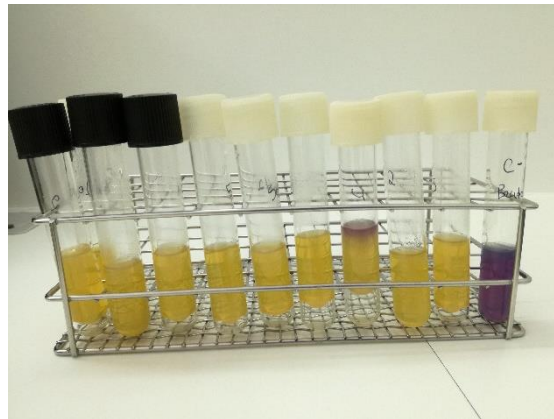
**Figura 24-** Aspeto típico de colónias de *Enterobacteriaceae* no meio de cultura VRBG (Fonte: Autor)

Para se proceder à confirmação das colónias, repicam-se 5 colónias características para PCA e incuba-se a placa a 37°C durante 24±2h. Posteriormente, são realizados o teste da oxidase (2.1.1.) e o teste da fermentação da glucose.

### 5.1.1. Teste da fermentação da glucose

Selecionam-se as colónias oxidase-negativa e repicam-se para tubos com meio de cultura de Glucose agar. Os tubos são incubados a 37°C durante 24±2h.

A fermentação da glucose observa-se pelo desenvolvimento de coloração amarela ao longo do tubo (Figura 25)



**Figura 25** - Exemplo de resultados positivos para a fermentação da glucose (tubos amarelos) e de resultado negativo não fermentação da glucose (tubo roxo) (Fonte:Autor).

Consideram-se como *Enterobacteriaceae* as colónias oxidase-negativas e que fermentem a glucose.

## 6. Enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva (ISO 6888-1:1999)

O meio de cultura utilizado, *Baird Parker Agar* (BP), é baseado na capacidade que os estafilococos têm em reduzir a telurite de potássio a telúrio, e é suplementado com emulsão de gema de ovo, que torna o meio amarelo e opaco. Os agentes seletivos glicina, cloreto de lítio e a telurite de potássio suprimem o crescimento da maioria das bactérias presentes nos alimentos, sem inibir o organismo alvo. Os *S. aureus* formam colónias brilhantes preto-cinzento escuro devido à redução da telurite a telúrio e

produzem zonas claras ao redor das colónias, por ação da lecitinase, que quebra a gema de ovo.

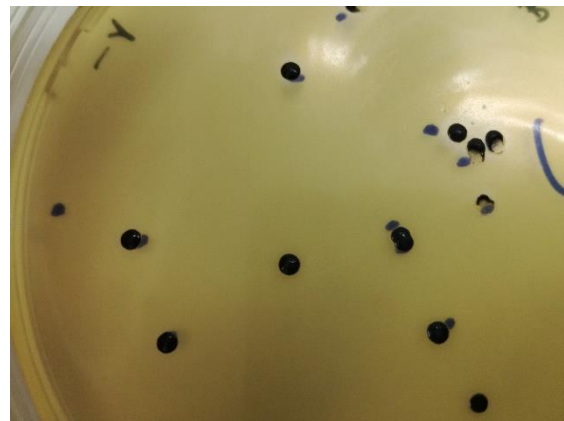
### 6.1. Procedimento

Transfere-se 0,1 mL da suspensão mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri contendo o meio de cultura seletivo BP. Espalha-se o inóculo através de movimentos rotativos com o espalhador e deixa-se secar durante 15 min. As placas são incubadas em aerobiose a 37°C durante 24 a 48 horas. Após incubação procede-se à leitura das placas. Selecionam-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150.

Consideram-se como colónias características, suspeitas de estafilococos coagulase-positiva, as de cor preta ou cinzenta, brilhantes, convexas e rodeadas por uma zona clara (Figuras 26 e 27). Consideram-se como colónias não características, suspeitas de estafilococos coagulase positiva, as de cor preta brilhante com ou sem uma fina extremidade branca; zona clara impercetível ou inexistente, e as de cor cinzenta sem zona clara.



**Figura 26** – Aspeto típico de colónias suspeitas de estafilococos coagulase-positiva no meio de cultura BP.



**Figura 27**- Aspeto típico de colónias suspeitas de estafilococos coagulase-positiva no meio de cultura BP.

Para a realização das provas de confirmação, selecionam-se 5 colónias características e 5 colónias não características (caso existam), repicam-se para PCA e incuba-se a placa a 37°C durante 24±2h. Após incubação realiza-se o teste da coagulase (5.1.4).

Consideram-se como Estafilococos coagulase-positiva as colónias que sejam coagulase-positiva.

## 7. Enumeração de bactérias sulfito – redutoras (ISO 15213:2003)

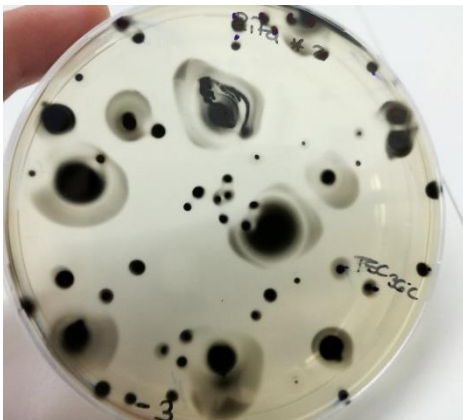
O meio de cultura utilizado para a enumeração das bactérias sulfito-redutoras é o TSC.

### 7.1. Procedimento

No caso de se pretender enumerar o número de esporos de bactérias sulfito-redutoras submete-se a suspensão inicial a tratamento térmico (banho-maria a 75°C durante 20 min).

Transfere-se 1 mL da solução mãe e das diluições preparadas para as respetivas placas de petri. Adicionam-se 12 a 15 mL do meio de cultura seletivo TSC e incorpora-se o meio com o inóculo através de movimentos rotativos. Após solidificação adiciona-se uma segunda camada de 5 a 10 mL de meio de cultura. As placas são incubadas em anaerobiose (6.1.1.) a 37±1°C durante 24 a 48 horas. Após o período de incubação, procede-se à leitura das placas.

Selecionam-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150. Consideram-se como colónias de bactérias sulfito-redutoras as que apresentem coloração negra e que por vezes estejam rodeadas por uma zona negra (Figuras 28 e 29).



**Figura 28** – Aspeto típico de colónias de bactérias sulfito-redutoras no meio de cultura TSC (Fonte: Autor)



**Figura 29** - Aspeto típico de colónias de bactérias sulfito-redutoras no meio de cultura TSC (Fonte: Autor)

## 8. Enumeração de *Clostridium perfringens* (ISO 7937:2004)

O meio de cultura utilizado é o TSC com a adição do antibiótico D-cicloserina (composto seletivo inibitório), que impede o desenvolvimento da flora contaminante em especial das outras espécies de *Clostridium*, reduzindo o tamanho dos halos negros à volta das colónias.

### 8.1. Procedimento

Transfere-se 1 mL da diluição mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri e adicionam-se cerca de 15 mL do meio de cultura TSC Agar (com D-cicloserina). Após solidificação do meio, as placas são incubadas em anaerobiose (6.1.1.) a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $20\pm 2$  horas. Por fim, procede-se à leitura das placas.

Consideram-se como colónias suspeitas de *Clostridium perfringens* as que apresentem cor negra e, por vezes, rodeadas por uma zona negra.

Selecionam-se 5 colónias características, bem isoladas e realizam-se provas de confirmação: redução dos nitratos, mobilidade e fermentação da lactose. No caso de não haver colónias bem isoladas, repicam-se 5 colónias para meio de cultura *Thioglycollate* e incuba-se em anaerobiose (6.1.1.) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante a 18 a 24 horas. Após incubação repicam-se as colónias para placas com meio de cultura TSC e adiciona-se uma nova camada de 10 mL de TSC. As placas são incubadas em anaerobiose (6.1.1.) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas.

#### 8.1.1. Teste da Fermentação da Lactose

Inoculam-se cada uma das colónias em lactose-gelatin medium, e incuba-se em condições anaeróbias (6.1.1.) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Um resultado positivo é dado pela formação de cor amarela e bolhas de gás. Arrefecem-se os tubos a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 1h e verifica-se se ocorre a liquefação da gelatina.

#### 8.1.2. Teste nitrato – mobilidade

Inoculam-se cada uma das colónias em nitrate-mobility medium por picada central e incubam-se os tubos em anaerobiose (6.1.1.) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Após incubação observa-se se houve crescimento para fora da zona da picada. Testa-se a presença de

nitritos adicionando-se 0,2 mL a 0,5 mL de reagente para deteção de nitritos e observa-se a formação de uma coloração vermelha. Caso não se observe formação de coloração vermelha durante 15 minutos, adiciona-se pó de zinco e deixa-se reagir por 10 minutos (se houver aparecimento de coloração vermelha não houve redução de nitratos).

Consideram-se como colónias de *Clostridium perfringens*, as imóveis que reduzem os nitratos a nitritos (cor vermelha ao adicionar reagente para pesquisa de nitratos ou não formação de cor após adicionar pó de zinco), que degradam a lactose produzindo ácido (coloração amarela) e gás (bolhas de gás) e liquefazem a gelatina.

## 9. Enumeração de Bolores e Leveduras (ISO 21527-1: 2008)

O meio de cultura utilizado, DRBC, contém *chloramphenicol* que suprime o crescimento das bactérias, permitindo o crescimento dos bolores e das leveduras. O agente antifúngico *dicloran* permite a redução do crescimento dos fungos com propagação rápida.

### 9.1. Procedimento

Transfere-se 0,1 mL da suspensão mãe e de cada diluição preparada para a respetiva placa de petri contendo o meio de cultura solidificado DRBC. Com a ajuda de um espalhador, através de movimentos rotativos, espalha-se o inóculo. As placas são incubadas em aerobiose a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias. Ao final deste tempo procede-se à leitura das placas. Selecionam-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 300.

Consideram-se como leveduras as colónias redondas de cor mate ou brilhante, com traçado regular e superfície convexa, e como Bolores as colónias achatadas ou “fofas” (em estrutura de algodão) com estruturas esporuladas.

## 10. Enumeração de *Bacillus cereus* (ISO 7932:2004)

O meio de cultura utilizado MYP permite a diferenciação de *Bacillus cereus* dos outros membros do género *Bacillus*, com base na fermentação do manitol e na produção da *lecitinase*. É um meio seletivo devido à presença de poliximina B que inibe o crescimento de bactérias de Gram negativo.

### 10.1. Procedimento

Transfere-se 0,1 mL da solução mãe e das diluições preparadas para as respetivas placas de petri contendo o meio de cultura MYP. Com um espalhador espalha-se o inóculo, através de movimentos rotativos. Deixa-se o inóculo secar durante 15 minutos e incubam-se as placas em aerobiose a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas. Após este período de incubação, caso as colónias não sejam claramente visíveis, incuba-se por mais 24 horas. Selecionam-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150.

Consideram-se como colónias suspeitas de *Bacillus cereus* as largas, rosa e geralmente rodeadas por um halo de precipitação (Figuras 30).



**Figura 30** - Aspeto típico de colónias suspeitas de *Bacillus cereus* no meio de cultura MYP (Fonte: Autor).

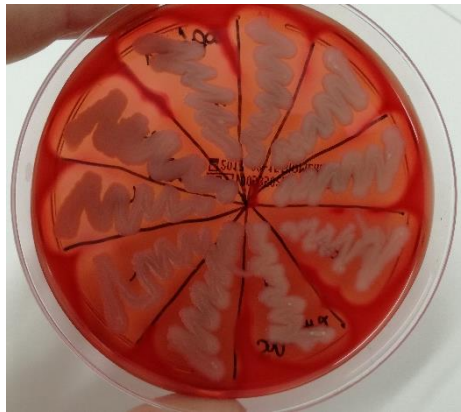
Para a realização das provas de confirmação selecionam-se 5 colónias características e repicam-se para meio PCA. Incuba-se em aerobiose a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas e, posteriormente, realiza-se o teste da hemólise em meio de sangue.

#### 10.1.1. Teste da hemólise

Repicam-se as colónias para meio de cultura Columbia 5% e incubam-se as placas em aerobiose a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 2\text{h}$ . Um resultado positivo é dado pela hemólise do sangue, presente no meio, visualizado através de um halo branco.

Consideram-se como colónias de *Bacillus cereus* as que apresentarem hemólise (Figura 31).





**Figura 31-** Exemplo de um resultado positivo no teste da hemólise em meio de cultura Columbia 5%.

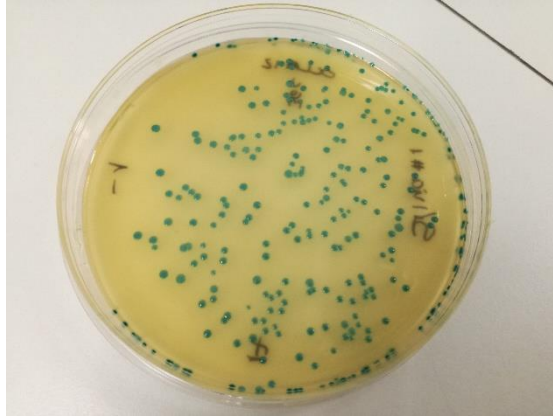
## 11. Enumeração de *Listeria sp* e *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2/Amd.1:2004)

O meio de cultura utilizado é o *Chromogenic Listeria Agar* (OCLA) que contém o cromogénio *X-glucoside* para a identificação presuntiva de *Listeria sp*. Este cromogénio é clivado pela  $\beta$ -glucosidase, que é comum a todas as espécies de *Listeria*. Outros microrganismos que possuem esta enzima, tais como os enterococos, são inibidos pelos agentes seletivos cloreto de lítio, polimixina B e ácido nalidíxico. A anfotericina inibe o crescimento de leveduras e fungos que podem estar na amostra. A *Listeria monocytogenes* é ainda diferenciada pela sua capacidade de produzir enzimas PIPLC e PCPLC que hidrolisam o fosfatidilinositol ou a lecitina, presentes no meio, originando um halo branco opaco em torno das colónias.

### 11.1. Procedimento

Deixa-se repousar a amostra em APT durante  $1h \pm 5$  min a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e só depois se preparam as diluições. Transfere-se 0,1 mL da solução mãe e das diluições preparadas para as respetivas placas de petri com meio de cultura OCLA, e espalha-se o inóculo através de movimentos rotativos com o espalhador. As placas são incubadas em aerobiose a  $37^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  horas. Caso não existam colónias características ao fim de 24 horas, deixa-se incubar por mais  $24 \pm 3$  horas. Após o tempo de incubação procede-se à leitura das placas, selecionando-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150.

Consideram-se como colónias suspeitas de *Listeria sp.* as de cor verde-azul, com ou sem halo (Figura 32); e como colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* as de cor verde-azul, rodeadas por um halo opaco.



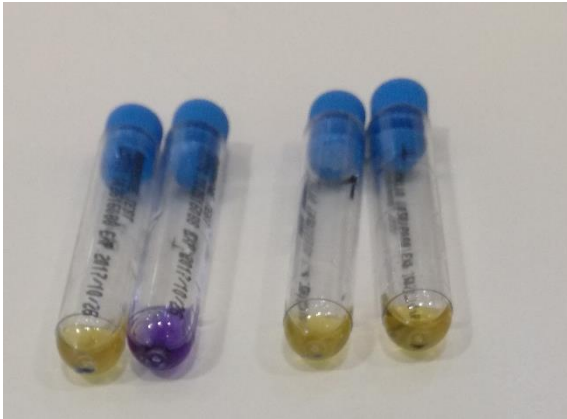
**Figura 32-** Aspeto típico de colónias suspeitas de *Listeria sp.* no meio de cultura OCLA (Fonte: Autor)

Para se realizarem as provas de confirmação, selecionam-se 5 colónias características e repicam-se para meio PCA. A placa é incubada a 37°C durante 18 a 24 horas. Após incubação são realizadas as seguintes provas de confirmação: Teste de catalase (5.1.2.) coloração de Gram (5.1.1.), teste de hemólise (10.1.1), teste da utilização dos carboidratos e teste de CAMP.

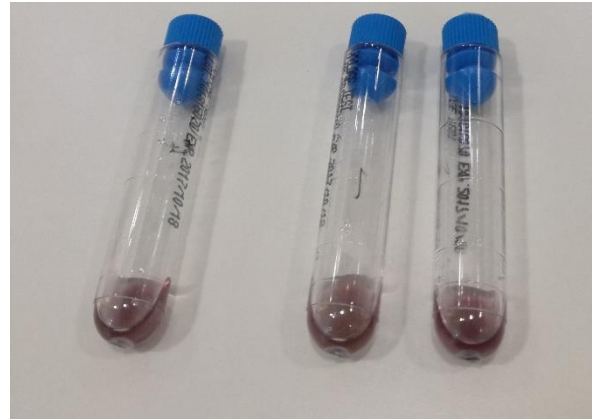
#### **11.1.1. Teste da fermentação dos carboidratos**

O teste da fermentação dos carboidratos é utilizada para determinar se a bactéria consegue ou não fermentar um carboidrato específico. É utilizado um indicador de pH, que altera de cor devido à acidificação do meio, resultante da fermentação.

Para se testar a utilização dos carboidratos repicam-se as colónias para tubos com Rhamnose e tubos com Xilose e incubam-se a 37°C durante 5 dias (as reações positivas verificam-se normalmente em 24 a 48 horas). Se a rhamnose for fermentada a cor do meio é alterada de roxo para amarelo (Figura 33); nos tubos de xilose é alterada de vermelho para amarelo (Figura 34).



**Figura 33** - Exemplo dos possíveis resultados no teste da Rhamnose (Fonte: Autor).



**Figura 34** - Exemplo de resultados negativos no teste da Xilose (Fonte: Autor)

### 11.1.2. Teste de CAMP

Inocula-se o *Staphylococcus aureus* desenhando uma linha vertical no meio de cultura de Columbia a 5%. De seguida, inoculam-se as colónias a testar e o controlo positivo, desenhando uma linha horizontal que se prolongue até ficar a 1 ou 2 mm do inóculo de *S. aureus*. As placas são incubadas a 37° C durante 18 a 24 horas.

Um resultado positivo é dado pelo aparecimento de uma pequena zona de hemólise que se estenda apenas por 3 mm desde o inóculo da amostra e com fraca zona de hemólise devido ao crescimento da cultura de *Staphylococcus aureus*. Zonas largas de hemólise não ocorrem na proximidade entre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Consideram-se como *Listeria sp.* as colónias com reação positiva no teste da catalase e que sejam bastonetes finos em forma de espiral Gram-positivos.

Consideram-se como *Listeria monocytogenes* as colónias que realizem hemólise, degradem a xilose e a ramnose e que apresentem uma reação positiva com *Staphylococcus aureus*.

## 12. Pesquisa de *Salmonella* (ISO 6579:2002)

A determinação da *Salmonella sp.* nos produtos alimentares consiste em detetar a presença desta bactéria numa quantidade específica do produto (25 gramas), mas o número deste microrganismo no alimento não é determinado. Apenas importa saber se este microrganismo está presente no alimento, e não em que quantidade. A pesquisa de *Salmonella sp.*, realiza-se em quatro fases principais: pré-enriquecimento,

enriquecimento, seleção e deteção. A fase de pré-enriquecimento é feita num meio líquido não seletivo e tem o objetivo de permitir que os microrganismos lesados durante a produção do alimento recuperem as lesões sofridas e se multipliquem, evitando falsos negativos. Este passo é crucial, uma vez que a produção alimentar envolve tratamentos tecnológicos, como por exemplo aquecimento e congelamento, que pode causar a morte das células ou ferimentos sub-letais (Wu, 2008). Os microrganismos lesados representam uma potencial ameaça para a segurança alimentar, uma vez que podem recuperar sob certas condições. Eles têm a capacidade de recuperar durante o tempo de prateleira, e podem multiplicar-se sendo prejudiciais para o consumidor (Zadernowska e Chajęcka, 2012). A fase de enriquecimento é feita em meios líquidos seletivos e serve para que apenas as células de salmonela se multipliquem em detrimento de outras. O meio de Caldo de Rappaport Vassiliadis com soja (Meio RVS) devido à sua temperatura de incubação, de 41,5°C, favorece o crescimento da espécie *Salmonella sp.*, e o meio de Caldo de Muller Kauffmann Tetrionato Novobiocina (Meio MKTTn) contém tiosulfato de sódio e iodeto de potássio que reagem formando um composto, conhecido como tetrionato de sódio, que inibe o crescimento de coliformes (Bager e Petersen, 1990). A fase de isolamento é realizada com meios de cultura sólidos seletivos para se obterem colónias individualizadas. Por fim, procede-se à seleção de colónias suspeitas e à sua confirmação com provas bioquímicas e serológicas.

#### 12.1. Preparação da solução - mãe

Para se preparar a diluição mãe pesa-se, assepticamente, 25 gramas do alimento, partindo-o em bocados pequenos (no caso de alimentos sólidos), com o auxílio de uma tesoura ou faca, estéril, para um saco de homogeneização (BagFilter). De seguida, juntam-se 225 mL de água peptonada tamponada, como solução diluente, e homogeneiza-se num homogeneizador, tipo stomacher, durante 2 minutos na frequência máxima. Por fim, o saco de homogeneização vai a incubar a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  durante  $18\pm 2\text{h}$ .

#### 12.2. Procedimento

Após a incubação transfere-se 0,1 mL para um tubo com 10 mL de meio RVS e, paralelamente, transfere-se 1 mL para um tubo com 10 mL de meio MKTTn. O tubo de RVS vai a incubar a  $41,5\pm 1^\circ\text{C}$ , durante  $24\pm 3\text{h}$  e o tubo de MKTTn a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , durante  $24\pm 3\text{h}$ . A partir dos dois tubos anteriores, inocula-se, com o auxílio de uma ansa, em duas placas de meio de cultura seletivo XLD e BG (2 XLD para RVS + 2 XLD para MKTTn + 2 BV para RVS + 2 BV para MKTTn) e incubam-se em aerobiose a  $37\pm 1^\circ\text{C}$

durante  $24\pm 3$ h. Após a incubação procede-se à leitura das placas. O restante procedimento é igual ao já referido em 8.1.

## Análises Microbiológicas a Manipuladores e Superfícies (ISO 18593:2004)

Durante o estágio foram analisadas diferentes amostras de zaragoas feitas a manipuladores e a superfícies. Estas análises têm como objetivo verificar se as metodologias de higienização são eficientes, ou seja, se os produtos de higienização são eficazes, se os manipuladores fazem a correta higienização das mãos, etc.

As amostras devem ser analisadas, preferencialmente, nas 24 horas após a sua receção. Caso não seja possível, devem ser armazenadas entre 1 a 4°C.

As amostras foram trabalhadas, pelo menos, com 2 diluições sucessivas, ou com 1 diluição em duplicado. Ao contrário dos alimentos, nas zaragoas não é necessário a preparação da solução-mãe. A suspensão inicial é o líquido de colheita que está no tubo. Para homogeneizar o conteúdo agita-se no vórtex durante 30 segundos. As preparações das diluições foram feitas como já descrito, anteriormente, em 1.2. Os parâmetros microbiológicos analisados dependem do que o cliente deseja analisar e pesquisar. Os ensaios são efetuados da mesma maneira que os dos alimentos.

## Cálculos e expressão dos resultados para alimentos e zaragoas

Após a leitura das placas e respetivas provas de confirmação (quando verificáveis), é necessário calcular o resultado do ensaio. O número de colónias presentes, representado por  $c$ , é definido nas seguintes situações:

- $c$  = somatório das colónias das várias diluições (unitárias ou duplicado), para contagens  $< 150$  ou  $300$ , em que pelo menos uma das placas tem um mínimo de 10 colónias

- $c = n^{\circ}$  de colónias na placa (unitárias ou duplicado), para contagens  $< 10$  colónias
- $c = \frac{a}{b} \times A$ , após identificação (confirmação) de colónias, em que  $a = n^{\circ}$  colónias identificadas,  $b = n^{\circ}$  de colónias a identificar (a efetuar provas de confirmação) e  $A = n^{\circ}$  de colónias totais (presuntivas de serem confirmadas).
- $c$  em zaragatoas =  $n^{\circ}$  de colónias  $\times$  o volume total do líquido da zaragatoa de colheita

O resultado pode ser calculado de acordo com as seguintes fórmulas:

Cálculo com colónias em diluições sucessivas unitárias:  $n = \frac{c}{v \times 1,1 \times d}$  em que

$v$  = volume de inóculo

$d$  = fator de diluição correspondente à 1ª placa com contagens

Cálculo com colónias  $\geq 4$  e  $< 10$  em diluições sucessivas unitárias:  $n = \frac{c}{v \times d}$  em que

$v$  = volume de inóculo

$d$  = fator de diluição correspondente às placas com contagens

Cálculo com colónias em diluições sucessivas em duplicado:  $n = \frac{c}{v \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$ , em que

$v$  = volume de inóculo

$d$  = diluição correspondente às 1ª placas com contagens

$n_1 = n^{\circ}$  de placas com colónias na 1ª diluição

$n_2 = n^{\circ}$  de placas com colónias na 2ª diluição

Cálculo com colónias  $\geq 4$  e  $< 10$  diluições sucessivas em duplicado:  $n = \frac{c}{v \times n \times d}$ , em que

$v$  = volume de inóculo

$d$  = diluição correspondente às placas com contagens

$n = n^{\circ}$  de placas com colónias

Quando há contagens de colónias, o resultado é arredondado a dois algarismos significativos e expresso entre 1,0 e 9,9 multiplicado pela adequada potência de 10 (ex:  $1,2 \times 10^3$ ). Na ausência de colónias, o resultado é dado como inferior ao limite de quantificação (ex:  $< 1,0 \times 10^1$ ). No caso de valores de colónias superiores ao valor máximo de contagem na última diluição, apresenta-se o resultado como “> valor calculado” (ex:  $> 1,0 \times 10^4$ ). Nos ensaios de presença/ ausência, o resultado é expresso como “presente” e “ausente” respetivamente.

A maioria das análises alimentares foi feita a refeições ou alimentos prontos a consumir, assim de modo a avaliar a qualidade microbiológica das análises, utiliza-se como referência o documento “Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados e prontos a comer” do INSA.

Nas zaragoas não há nenhuma legislação ou valores guias para interpretar os resultados, existe, apenas, uma recomendação da Saúde Pública que menciona que na contagem de microrganismos a 30°C o limite máximo é de 100 UFC/ zaragatoa ou 100 UFC/ cm<sup>2</sup>. Uma vez que as zaragoas servem para avaliar a eficácia das metodologias de higienização, se tudo estiver a ser feito de forma correta, os microrganismos patogénicos deverão estar ausentes, e as contagens dos restantes microrganismos deverão ser muito baixas, ou mesmo 0.

## Controlo de Qualidade dos ensaios

O controlo da qualidade associado à execução dos ensaios compreende o controlo de qualidade interno e externo. O controlo de qualidade permite ao laboratório verificar e garantir que os equipamentos, o material e os técnicos realizam o trabalho corretamente, de forma, a obter resultados fiáveis e coerentes.

Para o controlo de qualidade interno dos ensaios são realizados brancos, réplicas (duplicados, triplicados, ...), controlos positivos e controlos negativos. As réplicas são a análise da amostra “n” vezes nas mesmas condições de análise.

O branco representa a matriz e é tratado da mesma forma que a amostra, no entanto, não contém os microrganismos em análise. Os brancos servem para avaliar as condições em que as análises são efetuadas, e são preparados de acordo com a amostra, nomeadamente:

- Alimentos: água peptonada tamponada (APT)
- Águas: água desionizada, esterilizada a 121°C durante 15 minutos, deve ser armazenada na câmara de refrigeração (5±3°C), nunca por um período superior a 6 meses (ISO 8199).
- Zaragoas: zaragatoa estéril.

Os ensaios em branco, bem como os duplicados das amostras são efetuados semanalmente, sempre que o ensaio é executado. Os duplicados são efetuados para cada parâmetro analisado e para cada diluição.

Os controlos positivos são matrizes contaminadas naturalmente ou artificialmente (a partir de materiais de referência), que apresentam crescimento do microrganismo alvo, quando semeadas em meio de cultura específico para o crescimento do mesmo. O controlo positivo é executado sempre que seja necessário efetuar provas de confirmação, quando se pretende verificar o estado dos reagentes utilizados nas provas, ou para comparar o crescimento do microrganismo alvo num determinado meio de cultura. O controlo positivo é realizado com estirpes dos Materiais de Referência (MR'S).

Os controlos negativos são normalmente utilizados em provas de confirmação, e apresentam um resultado inverso ao esperado do microrganismo em análise para determinada característica.

## Ensaio Interlaboratoriais

Para o controlo de qualidade externo o laboratório participa em ensaios de comparação interlaboratoriais. Durante o estágio não foi possível participar nos ensaios interlaboratoriais, mas acompanhei e observei todo o procedimento.

Os ensaios Interlaboratoriais servem, sobretudo, para o laboratório verificar se o método utilizado é o mais adequado e se todas as variáveis (técnicos, equipamentos, reagentes, material) estão a reproduzir resultados fidedignos possibilitando, ainda, verificar a existência de eventuais desvios ou tendências, de forma a garantir que os mesmos sejam corrigidos.

O laboratório recebe as amostras reais com ou sem o microrganismo alvo, e os ensaios são executados do mesmo modo que as amostras de rotina. Posteriormente, os resultados são enviados à entidade competente para serem comparados e avaliados. Cada laboratório recebe o seu relatório de desempenho, com o z-score (fator de desempenho), que é calculado da seguinte forma:

$$\text{z-score} = [(\text{valor lido} - \text{valor alvo}) / \text{desvio padrão do ensaio}]$$

O resultado é apresentado como:

- Satisfatório:  $-2 \leq \text{z-score} \leq 2$
- Questionável:  $2 < \text{z-scores} < 3$  e  $-3 < \text{z-score} < -2$
- Não satisfatório:  $-3 \geq \text{z-score} \geq 3$



# Implementação do método NMP para as águas balneares

A legislação vigente permitia que se fizessem as análises às águas balneares quer pelo método de filtração em membrana, quer pelo método do número mais provável. A MicroChem tem implementado e acreditado o método de filtração em membrana, sendo que todos os ensaios realizados a águas são feitos por este método. No entanto, a APA, em dezembro de 2016, emitiu um ofício a comunicar que apenas aceitava resultados de laboratórios cujo método acreditado fosse o NMP. Sendo que a APA, segundo o decreto-lei nº113 de 2012, enquanto autoridade nacional da água, é a entidade competente para a coordenação e fiscalização deste decreto, o que é emitido por esta tem valor mandatário face ao que está legislado. Assim sendo, a MicroChem para continuar a analisar este tipo de águas terá que implementar e acreditar este método do Número Mais Provável.

De acordo com o sistema de gestão da qualidade que a MicroChem tem implementado, é necessário existir uma estrutura documental bem definida, fazendo parte desta os procedimentos de ensaio e os procedimentos técnicos. Para a implementação do método NMP, foi necessário elaborar os procedimentos de ensaio.

Os procedimentos de ensaio descrevem exclusivamente a realização de ensaios e são elaborados através de referências bibliográficas, no geral, segundo normas ISO. Estes não devem ser a tradução e transcrição íntegra da referência, devem conter, apenas, o essencial à execução concreta do ensaio de rotina.

Um procedimento de ensaio deve ser, sempre, identificado com: sigla, nº sequencial e revisão, data de emissão, responsável pela emissão e o número da página e total de páginas. No conteúdo deve incluir: o objetivo e âmbito de aplicação, onde se identifica de forma resumida, a que ensaio se refere o procedimento e a que matrizes se aplica; a descrição, onde se incluem todos os passos desde a execução do ensaio até à emissão de um resultado; as referências bibliográficas e, caso existam, os anexos.

Durante o estágio realizado foi dada a oportunidade ao estagiário de participar na implementação deste novo método, tendo sido estudadas as normas de referência e tendo ajudado na elaboração dos procedimentos de ensaio. Foram também, posteriormente, realizados alguns ensaios.

## 1. Procedimento

Este método é baseado nas ISO 6461-2 e ISO 7899-1 e tem por base a inoculação da amostra numa placa contendo 96 poços com meio de cultura desidratado e o substrato MUD (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoside) para a análise de Enterococos (Figura 35), e o substrato MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) (Figura 36), para a análise de *E. coli* e bactérias coliformes, que ao serem hidrolisados permitem a deteção da enzima específica. Esta enzima cliva o substrato produzindo uma fluorescência azul, quando observado com radiação UV a 366 nm.

### 1.1. Preparação da solução especial

Pesam-se 35 gramas de sal marinho sintético e dissolvem-se num 1L de água destilada. A solução é esterilizada em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

### 1.2. Preparação das diluições

Preparam-se os tubos esterilizados, numa raque, de acordo com o número de diluições. Adicionam-se 9 mL de água destilada ao primeiro tubo (dependendo da salinidade da amostra) e 9 mL da solução especial aos restantes tubos. Agita-se a amostra de forma a se obter uma distribuição homogénea dos microrganismos, e transferem-se 9 mL desta amostra para o primeiro tubo contendo 9 mL de água destilada (1:2). De seguida, transfere-se 1 mL desta diluição para o segundo tubo (1:20), e assim sucessivamente (1:200; 1:2000).

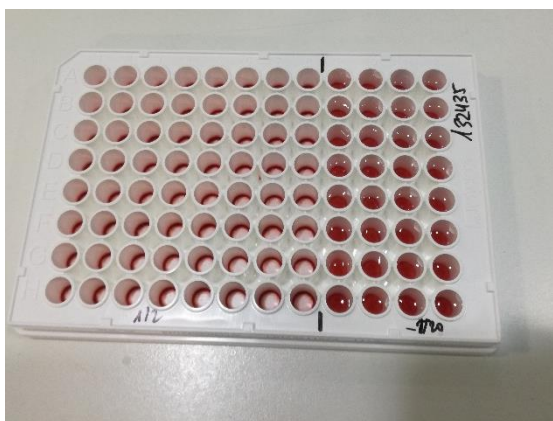
### 1.3. Inóculo

Pipetam-se 200  $\mu\text{L}$  do primeiro tubo para os poços da microplaca correspondentes à primeira diluição, e pipetam-se 200  $\mu\text{L}$  para os restantes poços, consoantes as diluições efetuadas. A microplaca é coberta com uma fita adesiva estéril e descartável (fornecido no kit) e é incubada a  $44^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 36 a 72 horas.

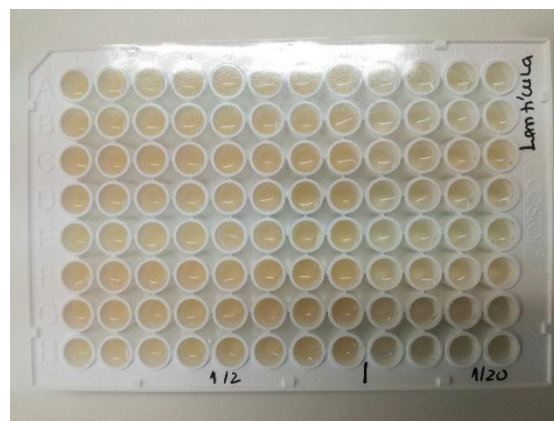
### 1.4. Leitura

As microplacas são observadas com a fita adesiva sob luz UV a 360 nm.

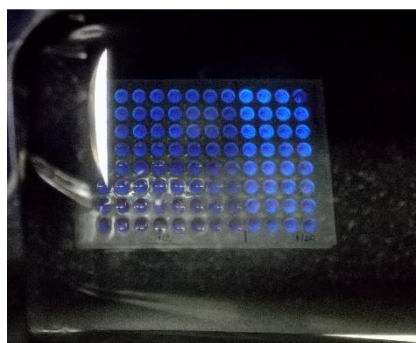
Consideram-se positivos todos os poços em que se observe uma fluorescência azul como indicativos da presença de enterococos ou *E. coli*, dependendo da microplaca utilizada (Figura 37).



**Figura 35** - Microplaca contendo meio de cultura MUD (Fonte: Autor).



**Figura 36** - Microplaca contendo meio de cultura MUG (Fonte: Autor)



**Figura 37** - Observação de fluorescência azul sob luz UV (Fonte: Autor)

### 1.5. Cálculos e expressão dos resultados

Para cada diluição é registado o número de poços com fluorescência azul (resultado positivo), e consultam-se as tabelas estatísticas e/ou utiliza-se um ficheiro de cálculos para a determinação do NMP. O resultado é expresso em NMP/ 100 mL.

## Validação de um meio de cultura para deteção e enumeração de *Legionella sp.* nas águas

Nos últimos anos, desenvolveu-se uma variada gama de meios cromogénicos que surgiram como uma alternativa aos meios de cultura convencionais. O uso destes meios

tornou-se um método chave para a identificação rápida de microrganismos em amostras clínicas (Merlino *et al*, 2000; Wendt *et al*, 2010). Os meios cromogénicos permitem a deteção de patogénicos com elevada especificidade, contendo substratos que, por hidrólise catalisada por enzimas presentes nos patógenos, libertam substâncias coradas, o que resulta na formação, por estes patógenos, de colónias que são facilmente diferenciáveis das formadas pelos microrganismos comensais. Idealmente, estes microrganismos comensais deveriam ser completamente inibidos por agentes seletivos, ou formar colónias incolores, permitindo assim que os patógenos se destacassem relativamente a outros microrganismos (Perry e Freydiere, 2007).

Durante o estágio curricular apresentado neste relatório, foi permitido ao estagiário começar um trabalho relativo à validação de um novo meio de cultura cromogénico, para deteção e enumeração de *Legionella sp.*, por comparação deste com o meio indicado na norma de referência. O CHROMagar para a deteção de *Legionella sp*, permite que as colónias cresçam com cor vermelha após 3 dias de incubação sendo, particularmente, bem visualizadas quando são utilizadas membranas de filtração (técnica de filtração por membrana). Quando expostas a luz UV as colónias são altamente fluorescentes.

Um material de referência, em microbiologia, consiste numa estirpe de referência com uma ou mais propriedades certificadas por um processo tecnicamente válido. Os materiais de referência são aconselhados para controlo de qualidade de laboratórios, validação e comparação de métodos, entre outras aplicações, e apresentam um elevado nível de qualidade assegurada, precisão e rastreabilidade, permitindo a obtenção de resultados fiáveis e reprodutíveis (ATCC; ielab, 2016). São simples e rápidos de utilizar e preparar, e são de fácil armazenamento e seguros, uma vez que a manipulação é reduzida ao mínimo. Para a validação do meio de cultura foram utilizados MR, porque com a utilização de amostras naturais podia não ser possível recuperar legionelas, devido à ausência de contaminação por estes microrganismos.

Para validar o meio de cultura cromogénico, foram realizados ensaios em simultâneo com o meio de cultura de referência, o GVPC. Os ensaios foram realizados segundo as normas ISO 11731-2 (Filtração) e ISO 11731 (Concentração).

Foram utilizados 3 tipos de matrizes: água da torneira da MicroChem, ou seja, da rede de abastecimento pública, água da garagem do centro empresarial da lionesa, proveniente de um poço, e água do rio Leça. Estas matrizes foram analisadas ao natural e contaminadas com material de referência de *Legionella pneumophila*.

Preparou-se uma cultura de 10 mL com material de referência de *Legionella pneumophilla*, segundo as instruções do fabricante, e inoculou-se 0,1 mL pela técnica de espalhamento, nos dois meios de cultura (CHROMagar e GVPC). De seguida, contaminaram-se as amostras naturais, 100 mL de cada matriz com 1 mL de inóculo de cultura de referência e 10 mL de cada matriz com 0,1 mL de inóculo de cultura de referência.

As análises procederam-se em duas etapas. A primeira etapa foi baseada na norma ISO 11731-2 (Filtração) e consistiu em filtrar-se 1 L das amostras naturais (sem contaminação) e 100 mL das amostras contaminadas, uma vez que era expectável uma maior carga microbiana. As membranas filtrantes foram posteriormente colocadas nos respetivos meios de cultura. A segunda etapa baseada na norma ISO 11731 (Concentração) consistiu em filtrar 3L das amostras naturais (sem contaminação) e 10 mL das amostras contaminadas. Após a filtração colocaram-se as membranas filtrantes num frasco estéril com 5 mL da respetiva amostra e agitaram-se, para ressuspender as colónias da membrana nos 5 mL. De seguida, semeou-se 0,1 mL diretamente nos meios de cultura e colocou-se 1 mL a 50°C durante 30 minutos. Ao final deste tempo, semeou-se nos meios 0,1 mL. Todas as placas foram incubadas a 36°C durante 10 dias e os resultados foram observados diariamente. Na tabela 12 encontra-se resumido todo o procedimento.

Os resultados obtidos não foram conclusivos, pelo que a MicroChem terá de reiniciar a validação deste meio. Apesar disso, foi possível observar-se em algumas placas o crescimento microbiano (Figuras 38, 39 e 40).

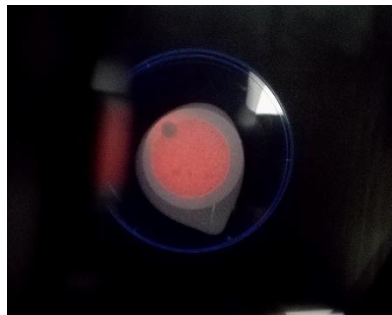
O meio de cultura cromogénico aparenta ser promissor, uma vez que os resultados, face ao meio convencional, poderão ser obtidos muito mais rapidamente (3 dias comparado com os 10 dias do meio convencional). Para além disso, tem ainda a vantagem de não ser necessária a realização de provas de confirmação de colónias, reduzindo a carga de trabalho para os técnicos, e talvez uma poupança monetária nos laboratórios, apesar de ser um meio de cultura mais caro que o convencional.



**Figura 38** - Aspeto típico de colónias suspeitas de *Legionella* sp. no meio de cultura GVP



**Figura 39** - Aspeto típico de colónias de *Legionella* sp. no meio de cultura cromogénico. .



**Figura 40** - Observação de fluorescência vermelha das colónias no meio de cultura cromogénico.

Tabela 12 - Quadro Resumo do procedimento realizado para validação do meio de cultura cromogénico.

	<b>Método</b>	<b>Rio Leça</b>	<b>Garagem</b>	<b>MicroChem</b>
<b>Amostra Natural</b>	ISO 11731-2 (filtração)	filtrar 1L de amostra		
	resultado	GVPC	GVPC	GVPC
	resultado	CROMO	CROMO	CROMO
	ISO 11731 (concentração)	filtrar 3L de amostra; colocar o filtro num frasco estéril com 5 mL de amostra; agitar para ressuspender as colónias da membrana nos 5mL; semear 0,1 mL (diretamente nos meios) e colocar 1 mL a 50°C/30min e, posteriormente, semear 0,1mL nos meios.		
	resultado	GVPC (direto) GVPC (térmico)	GVPC (direto) GVPC (térmico)	GVPC (direto) GVPC (térmico)
	resultado	CROMO (direto) CROMO (térmico)	CROMO (direto) CROMO (térmico)	CROMO (direto) CROMO (térmico)
<b>Amostra Contaminada</b>	ISO 11731-2 (filtração)	filtrar 100mL de amostra		
	resultado	GVPC	GVPC	GVPC
	resultado	CROMO	CROMO	CROMO
	ISO 11731 (concentração)	filtrar 10mL; colocar o filtro num frasco estéril com 5 mL de amostra; agitar para ressuspender as colónias da membrana nos 5mL; semear 0,1 mL diretamente nos meios e colocar 1 mL a 50°C/30min e, posteriormente, semear 0,1mL nos meios.		
	resultado	GVPC (direto) GVPC (térmico)	GVPC (direto) GVPC (térmico)	GVPC (direto) GVPC (térmico)
	resultado	CROMO (direto) CROMO (térmico)	CROMO (direto) CROMO (térmico)	CROMO (direto) CROMO (térmico)

## IV. Conclusão



## Considerações finais

O objetivo do estágio curricular foi a integração do estagiário num laboratório de microbiologia acreditado, tendo como principais funções a preparação e o respetivo controlo dos meios de cultura, e a análise microbiológica de alimentos, manipuladores, superfícies e águas através de métodos analíticos. A realização deste estágio curricular permitiu-me desenvolver competências técnicas e práticas, através da execução de metodologias de rotina em contexto laboratorial, tendo sido possível colocar em prática os conhecimentos adquiridos na Licenciatura em Biologia e no Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar.

Um dos aspetos a destacar é a importância da acreditação da MicroChem, sendo essencial para a realização dos ensaios, na maior parte dos casos, exigida pela legislação. A acreditação transmite uma maior confiança, aos clientes, em relação aos resultados obtidos. Compreender a organização e o funcionamento de um laboratório acreditado foi essencial, acarretando uma enorme responsabilidade. Uma boa análise das amostras é fundamental, pois resultados incorretos podem ter um forte impacto negativo na economia e na saúde pública. Os resultados falso-positivos podem levar a medidas desnecessárias tais como encerramento dos locais de recreio, no caso de piscinas, águas balneares e termais, publicidade negativa, ou mesmo implementação de medidas extras, com custos elevados. Os resultados falso-negativos podem expor a população e os consumidores a riscos diretos para a sua saúde, devido ao consumo de águas inadequadamente tratadas, ou alimentos contaminados devido a más práticas de fabricação e de higiene, ou devido à utilização de águas recreativas poluídas. Para além disto, o laboratório ao exportar resultados incorretos corre o risco de perder a sua acreditação e os seus clientes.

A correta preparação dos meios de cultura e o respetivo controlo de qualidade, são de extrema importância para se obterem resultados fidedignos. Se o meio de cultura for preparado de forma incorreta pode estar contaminado, levando a falsos-positivos, ou os seus componentes podem estar em mau estado/ degradados levando a falsos-negativos.

Apesar de todos os ensaios microbiológicos realizados serem baseados em normas internacionais, e estas descreverem todos os métodos e meios de cultura a utilizar, foi importante a pesquisa bibliográfica efetuada, de modo a compreender as vantagens e as limitações das técnicas utilizadas e compreender a relação da composição dos meios de cultura com as características das bactérias. O estudo da legislação vigente foi

necessário para compreender o porquê dos métodos utilizados para as análises, bem como os microrganismos e os valores recomendados ou máximos admissíveis.

A implementação do método NMP para as águas balneares, permitiu-me ter uma ideia de como se processa a implementação de um método, para futura acreditação. A elaboração dos procedimentos de ensaio é essencial, descrevendo o procedimento de formas simples e resumida, contendo apenas a informação essencial à sua realização, facilitando a sua consulta pelos técnicos de laboratório, de forma a executarem corretamente o ensaio, uma vez que as normas de referência descrevem extensivamente todo o procedimento.

Os ensaios de pesquisa de microrganismos patogénicos são demorados, complexos e de custo elevado, exigindo vários meios de cultura e provas de confirmação. A pesquisa por novos métodos mais simples e rápidos tem vindo a aumentar. O desenvolvimento de meios de cultura cromogénicos na pesquisa de microrganismos patogénicos promete ser promissor, diminuindo o tempo das análises, as provas de confirmação e tornando mais fácil a análise dos resultados. Neste estágio curricular foi possível iniciar a validação de um meio de cultura cromogénico para a pesquisa e quantificação de *Legionella*, por comparação com o meio de cultura recomendado pela norma de referência. Contudo, não foi possível obter resultados que permitam tirar conclusões, pelo que a validação terá que ser repetida.

A MicroChem disponibilizou todas as condições necessárias para o desenvolvimento do estágio, tendo este sido muito enriquecedor. O trabalho num laboratório é exigente, requer responsabilidade, concentração e capacidade de análise crítica. Este estágio permitiu-me o contacto com equipamentos e materiais aos quais não tive acesso durante a aprendizagem académica. A realização deste estágio provou ser uma mais valia na minha formação académica, profissional e pessoal.

## V. Referências Bibliográficas

- Abelho, M. (2010). Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental – Qualidade Microbiológica da Água. Curso de Especialização Tecnológica em Qualidade Ambiental. Disponível em: [http://www.esac.pt/Abelho/Monitor\\_ambiental/Manual%20parte%202.pdf](http://www.esac.pt/Abelho/Monitor_ambiental/Manual%20parte%202.pdf). Consultado em 22.ago.2017.
- Alimentar, P.D.S. Conteúdos - Segurança Alimentar. Introdução. Disponível em: <http://www.segurancalimentar.com/conteudos.php?id=20>. Consultado em: 21 mar.2017
- ASAE (2017). Riscos Biológicos. Disponível em: <http://www.asae.pt/pagina.aspx?f=1&back=1&codigono=596059636138AAAAAAAAAA>. Consultado em 24 ago.2017
- ATCC. Certified Reference Material. Disponível em: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Standards/Standards\\_Programs/Certified\\_Reference\\_Materials\\_CRMs.aspx](https://www.lgcstandards-atcc.org/Standards/Standards_Programs/Certified_Reference_Materials_CRMs.aspx). Consultado em: 25.ago.2017
- Ayçiçek, H., Aydoğan, H., Kuçukkaraas, A., Baysallar, M., Basustaoglu, A. C. (2004). Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. Food control. p.253-259.
- Bager, F e Petersen, J. (1990). Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. Acta Veterinaria Scandinavica. 32(4): p. 473-481.
- Bancroft, K., Nelson, E. T., Childers, G.W. (1989). Comparison of the presence-absence and membrane filter techniques for coliform detection in small, nonchlorinated water distribution systems. Applied and environmental microbiology. 55(2): p. 507-510.
- Baptista, P e Linhares, M. (2005). Higiene e Segurança Alimentar na Restauração. (1ª ed). Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Lda.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M. (editores). (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2ª ed). Volume 2. Part B.
- Buchrieser, C. (2011). *Legionella*: From Protozoa to Humans. Frontiers in Microbiology. 2 (182).
- Budnick, G. E., Howard, R. T., Mayo, D. R. (1996). Evaluation of Enterolert for enumeration of enterococci in recreational waters. Applied and Environmental Microbiology, 62(10), 3881–3884.
- Cabral, J. P. S. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. International Journal of Environmental Research and Public Health, 7(10), 3657–3703.

- CAC (1997). Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods. Codex Alimentarius Guidelines - Report No CAC/GL 21-1997
- CAC (2003). Código de Práticas Internacionais Recomendadas – Princípios Gerais de Higiene Alimentar – CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003.
- Calaça, T. C. (2003). Segurança Alimentar em Eventos. Monografia de Pós-graduação. Universidade de Brasília, Brasília.
- Candeias, G. (2014). Qualidade Microbiológica do gelo usado em estabelecimentos de restauração e bebidas. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Circular Normativa nº 14/DA. (2009) de 21 de agosto da Direção-Geral de Saúde.
- Correia, C. (2013) Boletim Epidemiológico. Investigação Laboratorial de toxinfecções alimentares.
- Decreto-Lei n.º 67/98 (1998) de 18 de março de 1998. Diário da República n.º 65 – I Série-A, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 236 (1998) de 1 de agosto de 1998. Diário da República n.º 176/1998 – I Série – A, Ministério do Ambiente, Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 306 (2007) de 27 de agosto de 2007. Diário da República nº 164, 1ª Série, Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- Decreto-Lei nº113 (2012) de 23 de maio de 2012. Diário da República nº100, 1ª série, Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território.
- Directiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Directiva 76/160/CEE.
- DGS. Beber água é essencial para a tua vida. Disponível em: [www.alimentacaosaudavel.dgs.pt](http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt). Consultado em: 22.ago.17
- EPA 600 – Membrane filter method for *C. perfringens*.
- Fenwick, A. (2006). Waterborne Diseases—Could they be Consigned to History? Science. 313:1077–1081.
- Ferreira, W. F. C e Sousa, J. C. F. (1998). Microbiologia. Volume 1. Lidel, edições técnicas. 342p.

- Ferreira, W. F. C e Sousa, J. C. F. (2000). Microbiologia. Volume 2. Lidel, edições técnicas. 350p.
- Fields, B. S., Benson, R. F., Besser, R. E. (2002). *Legionella* and Legionnaires Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(3): p. 506-526.
- Forsythe, S. J. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. (1ª ed). Blackwell Science Ltd., Osney Mead, Oxford, Reino Unido. 412p.
- Gauthier, F e Archibald, F. (2001). The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. 35(9):2207-18.
- Gomes, S. (2010). Integração dos sistemas normativos (ISO 22000, IFS e BRC) na indústria alimentar. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa,
- Grabow WOK. (1996). Waterborne Diseases: Update on Water Quality Assessment and Control. *Water SA*. 22:193–202.
- Green, L. R., Selman, C. A., Radke, V., Ripley, D., Mack, J. C., Reimann, D. W., ... e Bushnell, L. (2006) Food worker hand washing practices: an observation study. *Journal of Food Protection*. p.2417-2423.
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, JL., Oliver, A. (2007). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4329–4335.
- Hilário, S. (2011). Segurança alimentar em cantinas escolares. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.
- HPA (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. Disponível em [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1259151921557](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1259151921557).
- ICMFS (2006). A Simplified guide to understanding and using food safety objectives and performance objectives. Disponível em: <http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoEnglish.pdf>
- Ielab (2016). Reference materials catalogue for physical-chemical and microbiological laboratories.

- ISO 6461-2 (1986). Water quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) – Part 2: Method by membrane filtration
- ISO 7899-1 (1998). Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water.
- ISO 9308-3 (1998). Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E.coli* in surface and waste water.
- ISO 6222 (1999). Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
- ISO 6888-1(1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker Agar medium.
- ISO 7899-2 (2000). Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 2: Membrane filtration method.
- ISO 16649-2 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide.
- ISO 15213 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.
- ISO 4833 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C.
- ISO 11731 (1998). Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*.
- ISO 11731-2 (2004). Water quality – Detection and enumeration of *Legionella* – Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts
- ISO 11290-2/Amd.1 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method – AMENDMENT 1: Modification of the enumeration medium
- ISO 18593 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs.
- ISO 21528-2 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count method.

- ISO 7932 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30°C.
- ISO 7937 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique
- ISO 8199 (2005). Water Quality - General Guidance on the enumeration of microorganisms by culture.
- ISO 16266 (2006). Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration.
- ISO 4832(2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.
- ISO 21527-1(2008). Microbiology of food and feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
- ISO 19250 (2010). Water quality – Detection of *Salmonella spp.*
- ISO 11133 (2014). Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- ISO 9308-1 (2014) .Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- Jay, J. M. (1998). Modern Food Microbiology. (5ª ed). Gaithersburg: Aspen Publishers. 661p.
- Jouve, J. L., Stringer, M. F., Baird-Parker, A. C. (1998). ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force, Brussels. Food Safety Management Tools.
- Lacasse, D. (1995) Introdução à Microbiologia Alimentar. Tradução Portuguesa. Instituto Piaget, Lisboa, Portugal, 577p.
- Lange, B., Strathmann, M., Obmer, R. (2013). Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bactéria. Letters in Applied Microbiology
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (1997). Brock Biology of microorganisms. (8ª ed), Simon & Schuter (Ed), Prentice-Hall, Inc., EUA.
- Mossel, D. A. A. (1982). Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. Antonie van Leeuwenhoek, 48: 609-611



- Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C. B., Baird, R. M. (1995). *Essentials of the Microbiology of Foods*. John Wiley & Sons. 699p.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (1998). Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. *J Food Prot* .61:1246–1259
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., e Sachaechter, M. (1990). *Psychology of the bacterial cell - a molecular approach*. Sinauer Associates. Sunderland. USA.
- Nicolau, C. J. e Oliver, A. (2010). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Programa Externo de Control de Calidad SEIMC, 28, p.19-28.
- Nollet, L. M. L. e Gelder, L. S. P. (2013). *Handbook of Water Analysis*. (3ª ed). CRC Press. 995p.
- NP 4343. *Qualidade da água – Pesquisa e quantificação de Estafilococos*.
- NSWFA (2009). *Microbiological quality guide for ready-to-eat foods. A guide to interpreting microbiological results*.
- Nunes, E. e Breda, J. (2001). *Manual para uma alimentação saudável em jardins de infância*. DGS. Divisão de Promoção e Educação para a Saúde. Lisboa
- OMS (1989). *Métodos de vigilância sanitária y de gestión para manipuladores de alimentos*. Organización Mundial de Saúde, Genebra, Suíça, 56 p.
- OMS (2006). *Cinco Chaves para uma Alimentação mais Segura: manual*. Tradução portuguesa. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Portugal. p.28. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/consumer/5KeysManual\\_pt.pdf](http://www.who.int/foodsafety/consumer/5KeysManual_pt.pdf)
- Pelczar Jr, M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. (1997). *Microbiologia: conceitos e aplicações*. (2ª ed). São Paulo: Makron Books.
- Pinto, A. (1996). Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Millenium*, 4:91-100.
- Pinto, J. e Neves, R. (2008). *HACCP – Análise de Riscos no Processamento Alimentar*. Publindústria, Edições Técnicas, Porto, Portugal, 162 p.
- Portaria n.º 1220 (2000) de 29 de dezembro de 2000 do Ministérios da Economia e da Saúde.
- Portaria n.º 353-A (2013) de 4 de dezembro de 2013 do Ministérios do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia, da Saúde, e da Solidariedade, Emprego e Segurança Social.

- Prescott, Harley e Klein (1996). *Microorganisms and Environment*. Em Elizabeth M. Sievers. *Microbiology*. (3ª ed) Wm. C. Brown Publishers, USA, pp 850-851.
- Rane, S. (2011). Street vended food in developing world: hazard analyses. *Indian Journal Microbiology*. p.100–106
- Ray, B. (2005). *History and Development of Food Microbiology*. *Fundamental food Microbiology*.
- Ryan, K. J. e Ray C. G. (2003). *Sherris Medical Microbiology*. (4ª ed). Mcgraw-hill. 992p.
- Regulamento (CE) nº 852/2004 de 29 de abril (2004) Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* nº L 139/1, pp. 1-18.
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. 2005, *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. 2007, *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Santos, M., Correia, C., Cunha, M. I. C., Saraiva, M. M., Novais, M. R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista Ordem Dos Farmacêuticos* 64: p. 66-68.
- Santos, N. (2011). *Controlo de Qualidade em Laboratório de Ensaios*. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Viseu.
- Serrazina, V. F. (2013). *Higiene das mãos dos manipuladores de alimentos dos estabelecimentos de restauração e bebidas do concelho de Alcobaça*. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa.
- Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., Gomes, R. A. R., Okazaki, M. M. (2007). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. (3ª ed). São Paulo: LOGOMARCA VARELA 109p. Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc/174416175/Livro-Manual-de-Metodos-de-Analise-Microbiologica-de-Alimentos>. Consultado em: 24.ago.2017
- Siqueira, R. S. (1995). *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA. 159p.

- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. H. (Editores). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (1ª ed). Volume 2.
- Steel, K. J. (1961). The oxidase reaction as a taxonomic tool. *Microbiology*, 25(2), 297-306.
- Tirado, C. e K. Schmidt (2001). WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications: Preliminary Results and Trends Across Greater Europe. *Journal of Infection*.. 43(1): p. 80-84.
- Tortora, G. J., Case, C. L., Funke, B. R. (2016). *Microbiologia – 12ª Edição*. Artmed Editora. 964p.
- Trickett, J. (2001) *The Prevention of Food Poisoning*. (4ª ed). Nelson Thornes Ltd;
- Valéria, M. Prática 03: Técnica de coloração Gram. Curso de Tecnólogo em Radiologia. Centro Universitário Christus.
- Whiting, R. C., Rainosek, A., Buchanan, R. L., Miliotis, M., LaBarre, D., Long, W., Ruple, A., Schaub, S. (2006). Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective. *International Journal of Food Microbiology*. 110(3): p. 263-267.
- WHO (World Health Organization) (2008). *Guidelines for Drinking-water Quality, Incorporating 1st and 2nd Addenda, Volume 1, Recommendations*. (3ª ed). WHO; Geneva, Switzerland:
- Wu, V. C. H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. Vol. 25, pp: 735-744
- Zadernowska, A., Chajęcka, W. (2012). *Detection of Salmonella spp. Presence in Food, Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Dr. Barakat S M Mahmoud (Ed.). ISBN: 978-953-307-782-6. InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/detection-ofsalmonella-spp-presence-in-food>. Consultado em: 21 mar.2017