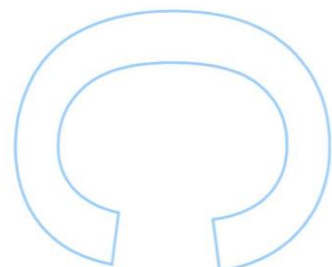
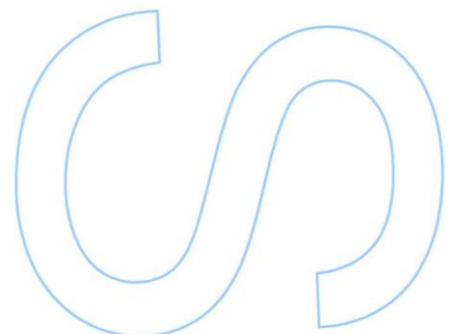
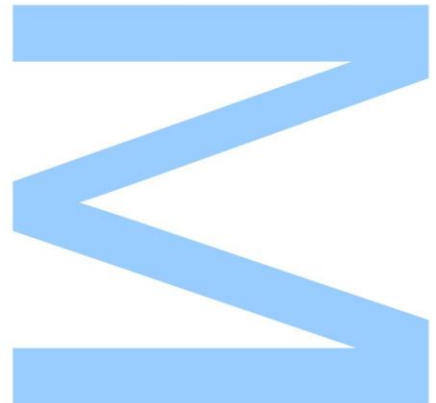


Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____





Universidade do Minho



Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

**Execução de ensaios microbiológicos e
atividades conexas nas áreas alimentar,
ambiental e técnica, em contexto empresarial
(laboral) – Laboratório MicroChem**

Ana Rita Botelho

Orientador: Prof. Doutor Nuno Mateus

Supervisora: Eng. Sílvia Silva

Porto

2016

AGRADECIMENTOS

Neste espaço faço os agradecimentos às instituições, orientadores e demais pessoas que me ajudaram na realização da dissertação de Mestrado, pois sem essa ajuda, todo o trabalho realizado ao longo deste ano seria muito mais difícil de realizar.

Em primeiro lugar, começo por agradecer à Faculdade de Ciências, à Universidade do Minho por me proporcionarem a oportunidade de aprender cada vez mais sobre uma área que tanto me agrada ao aceitarem-me no Mestrado de Tecnologia e Ciência Alimentar. Queria de igual modo agradecer ao Laboratório da MicroChem por me permitir ter as condições essenciais para desenvolver este estágio onde tanto aprendi.

De seguida, quero agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Nuno Mateus, por toda a sua disponibilidade e todo o apoio incondicional que me deu ao longo deste ano.

Agradeço também à minha supervisora no local, Eng. Sílvia Silva, por estar sempre presente e disponível sempre que necessitei e pela ajuda e apoio que demonstrou ao longo do estágio. Quero também evidenciar a ajuda prestada pela colega de laboratório Sofia Costa que me acompanhou diariamente, ensinando-me e ajudando-me em todas as alturas.

Seguidamente agradeço à minha família. Aos meus pais, ao meu irmão e às minhas duas avós por me terem proporcionado condições para realizar este trabalho e por todo o apoio que me deram ao longo deste ano.

Quero também agradecer aos meus amigos e antigos colegas de Licenciatura, Bruno Barros, Vasco Cardoso e Alexandra Pinto, mas em especial à Cátia Custódio por todo o apoio e ajuda proporcionada ao longo do ano.

Agradeço também à minha amiga e colega de Mestrado, Sara Miranda por partilhar comigo as dificuldades do Mestrado, desejando-lhe o maior sucesso também nesta fase.

Quero também agradecer a todos os que me apoiaram e ajudaram ao longo deste relatório de estágio e que possam não ter sido em cima mencionados.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

De todos os seres vivos são os microrganismos aqueles que apresentam maior versatilidade nos processos que utilizam para obter energia, existindo nos cursos de água, quer sejam límpidas ou poluídas, no ar que respiramos e podendo estar presentes nos alimentos que ingerimos.

Os microrganismos podem ser classificados em autotróficos, que fabricam os seus próprios nutrientes através de fontes simples de carbono, ou heterotróficos, quando utilizam moléculas já existentes. Estes microrganismos podem ser classificados segundo diversos grupos: bactérias, fungos, algas unicelulares e protozoários e vírus.

Muito sucintamente, as bactérias são seres de pequenas dimensões que possuem diversos tipos morfológicos; relativamente aos fungos, estes apresentam apenas dois tipos de formas: leveduras ou fungos filamentosos e multicelulares. Estes dois grupos mencionados anteriormente são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica. Os protozoários constituem um grupo de microrganismos com grande diversidade morfológica e fisiológica, com organização celular eucariótica e são caracterizados por não possuírem parede celular. Por fim, tem-se o grupo dos vírus que formam um conjunto de entidades dos quais alguns são altamente patogénicos para os restantes seres vivos, apresentam dimensões muito reduzidas, havendo certas exceções.

Ao longo do estágio, foram feitas análises microbiológicas a diferentes tipos de águas, a alimentos de diversos grupos alimentares e zaragatoas de superfícies e manipuladores. Neste processo, foram analisadas, por exemplo, águas de piscina, de consumo, alimentos como refeições prontas a comer e bolos de pastelaria, e em termos de zaragatoas, analisou-se as superfícies de contacto com alimentos bem como as mãos de quem manipula os alimentos.

Estas análises microbiológicas foram realizadas através de diferentes técnicas: incorporação, espalhamento e filtração por membranas. A incorporação corresponde à técnica em que é pipetada 1,0 mL de amostra à qual é adicionado o meio de cultura; o espalhamento corresponde à técnica em que o é pipetado 0,1 mL da amostra para um meio de cultura solidificado. Por fim, tem-se a filtração por membranas, em que é filtrado para um copo de filtração a amostra em questão, ficando retidos os sedimentos na membrana, que posteriormente será colocada num meio de cultura já solidificado.

Os resultados obtidos no final destas análises são comparados com as tabelas normativas correspondente a cada matriz de amostra utilizada e declarados como conformes ou não conformes.

Palavras-chave: águas, alimentos, espalhamento, filtração por membranas, incorporação, microbiologia, microbiologia alimentar, zarações.

ABSTRACT

Of all the living beings, the microorganisms are those with greater versatility in the processes they use to obtain energy, existing in water courses, either clear or polluted, in the air we breathe and may be present in the food we eat.

The microorganisms can be classified into autotrophs, which produce their own nutrients through simple carbon source, or heterotrophic when using existing molecules. These microorganisms can be classified according to several groups: bacteria, fungi, unicellular algae and protozoa and viruses.

Very succinctly, the bacteria's group are small beings that have different morphological types; respectively to fungi, they present only two types of forms, yeasts or filamentous and multicellular fungi. These two groups mentioned above are responsible for the decomposition of organic matter. Protozoa are a group of microorganisms with great physiological and morphological diversity, and with eukaryotic cell organization are characterized by not having a cell wall. Finally, there is the group of viruses that form a set of entities, some of which are highly pathogenic for all other living beings, have very reduced dimensions, with certain exceptions.

Throughout the internship, microbiological analysis were tested in different types of water, foods of various food groups and surfaces and manipulators swabs. In this process, were analyzed, e.g., pool water and consumptions water, foods such as ready meals, cakes and pastries, and in terms of swabs, we analyzed the areas of contact with food as well as the hands of those who manipulates foods.

These microbiological analysis were performed through different techniques: incorporation, spreading and membrane filtration. The incorporation corresponds to the technique that is 1,0 mL pipetted to which is added to the culture medium; the spreading technique it corresponds to that 0,1 ml of the sample which is pipetted to a

solidified culture medium. Finally, there is membrane filtration in which filtration is filtered into a glass sample, the pellets are retained on the membrane, and then placed in a culture medium already solidified.

The final results at the end of these analysis are compared with the corresponding normative tables and certified as conforming or non-conforming.

Keywords: food, food microbiology, incorporation, membrane filtration, microbiology, spreading, swabs, water.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XVI
ENQUADRAMENTO	1
A empresa	1
O laboratório:	4
Objetivo de estágio.....	5
REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS.....	6
ÁGUA.....	6
Metodologias analíticas.....	7
ALIMENTOS	7
Comportamento dos microrganismos nos alimentos.....	7
Parâmetros intrínsecos e extrínsecos que afetam os alimentos	7
Pesquisa, identificação e quantificação de microrganismos nos alimentos.....	8
ZARAGATOAS.....	8
Avaliação microbiológica de superfícies.....	8
SEGURANÇA ALIMENTAR MICROBIOLÓGICA	9
MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	9
TABELAS NORMATIVAS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA	10
MATERIAL E MÉTODOS	20
Higienização e Controlo Ambiental do laboratório de Microbiologia	20
Controlo da Qualidade em ensaio de Microbiologia.....	23
Preparação e Controlo de Qualidade de Meios de Cultura (ISO 11133):.....	26
1 - ÁGUAS.....	32
1.1-Microrganismos a 22°C e 36°C (ISO 6222):.....	35
1.2- <i>Escherichia coli</i> e Bactérias coliformes (ISO 9308-1):	36
1.3-Enterococos intestinais (ISO 7899-2):	37
1.4- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ISO 16266):	38
1.5-Estafilococos sp. (Método Interno – NP 4343):	39

1.6-Clostridium perfringens (EPA 600):.....	40
1.7-Esporos de Anaeróbios sulfito-redutores (ISO 6461-2):.....	41
1.8-Legionella sp. (ISO 11731-2):.....	42
1.9-Salmonella sp. (ISO 19250):.....	43
1.10-Fungos (SMEWW 9610 D):	45
1.11-Mycobacterium sp. (SMEWW 9260 M (c)):.....	46
2 - ALIMENTOS E ZARAGATOAS	47
2.1-Microrganismos a 30°C (ISO 4833-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	51
2.2-Bactérias Coliformes a 30°C (ISO 4832-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	52
2.3-Escherichia Coli (ISO 16649-2-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) -zaragatoas):.....	54
2.4-Enterobacteriaceae (ISO 21528-2-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	55
2.5-Estafilococos coagulase-positiva (ISO 6888-1-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	56
2.6-Bactérias sulfito-redutoras (ISO 15213-alimentos):	57
2.7-Clostridium perfringens (ISO 7937-alimentos):.....	58
2.8-Salmonella (ISO 6579-alimentos; ISO 18593 (8 e 9)-zaragatoas):.....	60
2.9-Bolores e Leveduras (ISO 21527-1-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	61
2.10-Bacillus cereus (ISO 7932-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	63
2.11-Listeria sp. e Listeria monocytogenes (ISO 11290-2/Amd.1-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	64
2.12-Microrganismos psicotróficos (ISO 17410-alimentos):.....	65
3 - AMOSTRAS DE AR (EN 13098 (7 E 8))	66
RESULTADOS, PROVAS DE CONFIRMAÇÃO E CÁLCULOS	69
1-ÁGUAS.....	69
1.1-Microrganismos a 36°C e 22°C (ISO 6222):.....	69
1.2-Escherichia coli e bactérias coliformes (ISO 9308-1):.....	69
1.3-Enterococos intestinais (ISO 7899-2):	70
1.4-Pseudomonas aeruginosa (ISO 16266):	71
1.5-Estafilococos sp. (Método Interno - NP 4343):	72
1.6-Clostridium perfringens (EPA 600):.....	74
1.7-Esporos de Anaeróbios sulfito-redutores (ISO 6461-2):.....	75
1.8-Legionella sp. (ISO 11731-2):.....	76
1.9-Salmonella sp. (ISO 19250):.....	78

1.10-Fungos (SMEWW 9610 D):	81
1.11- <i>Mycobacterium sp.</i> (SMEWW 9260 M):	81
CÁLCULOS PARA AS ÁGUAS	82
Exemplos de resultados para diferentes águas.....	84
2-ALIMENTOS E ZARAGATOAS.....	87
2.1- Microrganismos a 30°C (ISO 4833–alimentos;ISO 18593 (8 e 9)-zaragatoas):87	
2.2-Bactérias coliformes a 30°C (ISO 4832-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	88
2.3- <i>Escherichia coli</i> (ISO 16649-2-alimentos; ISO 18593 (8 e 9)-zaragatoas):.....	88
2.4- <i>Enterobacteriaceae</i> (ISO 21528-2-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):88	
2.5-Estafilococos coagulase-positiva (ISO 6888-1-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	89
2.6-Bactérias sulfito-redutoras (ISO 15213-alimentos):	91
2.7- <i>Clostridium perfringens</i> (ISO 7937-alimentos):.....	92
2.8- <i>Salmonella</i> (ISO 6579-alimentos; ISO 18593 (8 e 9)-zaragatoas):.....	93
2.9-Bolores e Leveduras (ISO 21527-1-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) - zaragatoas):	97
2.10- <i>Bacillus cereus</i> (ISO 7932-alimentos; ISO 18593 (8 e 9) -zaragatoas):	97
2.11- <i>Listeria sp.</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO 11290-2/Amd.1-alimentos; ISO 18593 (8 e 9)-zaragatoas):	98
2.12-Microrganismos psicrotróficos (ISO 17410-alimentos):	100
CÁLCULOS PARA ALIMENTOS E ZARAGATOAS.....	100
Exemplos de resultados para diferentes alimentos	103
Exemplos de resultados de zaragatoas	106
3 – BACTÉRIAS E FUNGOS (EN 13098 (7 e 8)).....	108
CÁLCULOS PARA AMOSTRAS DE AR.....	109
Exemplo de resultados de amostra de ar	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	I
ANEXOS	IV

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 – Zaragatoa em gel

Fig. 2 – Amostras de alimentos

Fig. 3 – Zaragatoa líquida

Fig. 4 – Bag Mixer – *Stomacher*

Fig. 5 – *E. coli* e coliformes em meio CCA

Fig. 6 – *E. coli* e coliformes em meio CCA

Fig. 7 – *P. aeruginosa* em meio CN

Fig. 8 – *P. aeruginosa* em meio CN

Fig. 9 – Estafilococos sp.

Fig. 10 – Estafilococos sp.

Fig. 11 – Teste de tipo respiratório

Fig.12 – *Clostridium perfringens* em água

Fig.13 – *Clostridium perfringens* em água

Fig. 14 – Prova de confirmação com amónia

Fig.15 – Prova de confirmação com amónia

Fig. 16 – Microgen-A

Fig. 17 – Identificação bioquímica para *Legionella*

Fig. 18 - *Mycobacterium*

Fig. 19 – Solução de Fucsina

Fig. 20 – Lavagem da solução de Fucsina

Fig. 21 – Solução de Azul Metileno

Fig. 22 – Lavagem da solução de Azul Metileno

Fig. 23 – Microrganismos em PCA

Fig. 24 – Estafilococos coagulase positiva

Fig. 25 – *Salmonella* em meio XLD

Fig. 26 - *Salmonella* em meio VB

Fig. 27 - Tubos de TSI para confirmação de *Salmonella*

Fig. 28 – Microgen-A

Fig. 29 - Identificação bioquímica de *Salmonella*

Fig. 30 – Identificação de *Salmonella* no programa informático

Fig. 31 – Verificação de aglutinação confirmando presença de *Salmonella*

Fig. 32 – Leveduras em meio DRBC

Fig. 33 – Leveduras em meio DRBC

Fig. 34 – Fungos em meio MEA com cloranfenicol

Fig. 35 – Fungos em meio MEA com cloranfenicol

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Ensaio relativo à água

Tabela 2 – Ensaio relativo ao ar

Tabela 3 – Ensaio relativo ao ambiente e resíduos

Tabela 4 – Ensaio relativo a produtos alimentares

Tabela 5 – Ensaio relativo a higiene de processos

Tabela 6 – Ensaio relativo ao meio hospitalar

Tabela 7 – Ensaio relativo à indústria

Tabela 8 – Valores tabelados para as águas de consumo

Tabela 9 – Valores tabelados para as águas de piscina

Tabela 10 – Valores tabelados para as águas termais

Tabela 11 – Valores tabelados para *Legionella sp*

Tabela 12 – Valores tabelados para as águas balneares

Tabela 13 – Valores tabelados para as águas balneares

Tabela 14 – Valores tabelados para as águas de rega

Tabela 15 – Grupos de alimentos designados pelo INSA

Tabela 16 – Valores tabelados para os alimentos do Grupo 1 segundo o INSA

Tabela 17 – Valores tabelados para os alimentos do Grupo 2 segundo o INSA

Tabela 18 – Valores tabelados para os alimentos do Grupo 3 segundo o INSA

Tabela 19 – Valores tabelados para alimentos de padaria/pastelaria

Tabela 20 – Valores tabelados para alimentos de padaria/pastelaria

Tabela 21 – Valores tabelados para alimentos horto/frutícula

Tabela 22 – Valores tabelados para preparados de carne

Tabela 23 – Valores tabelados para carcaças de bovinos, ovinos, caprinos e equídeos

Tabela 24 – Valores tabelados para carcaças de suínos

Tabela 25 – Valores tabelados para carcaças de frango e peru

Tabela 26 – Valores tabelados para carne picada e separada automaticamente

Tabela 27 – Valores tabelados para as zaragatoas de superfícies, manipuladores e utensílios

Tabela 28 – Valores tabelados para as zaragatoas de amostras de ar

Tabela 29 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de microorganismos a 36°C e 22°C em água

Tabela 30 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *E. coli* e bactérias coliformes em água

Tabela 31 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Enterococos intestinais em água

Tabela 32 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Pseudomonas aeruginosa* em água

Tabela 33 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Estafilococos sp. em água

Tabela 34 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Clostridium perfringens* em água

Tabela 35 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Esporos de anaeróbios sulfito-redutores em água

Tabela 36 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Legionella* sp. em água

Tabela 37 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Salmonella* sp. em água

Tabela 38 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Fungos em água

Tabela 39 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Mycobacterium sp.* em água

Tabela 40 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Microrganismos a 30°C em alimentos e zaragatoas

Tabela 41 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Bactérias coliformes a 30°C em alimentos e zaragatoas

Tabela 42 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Escherichia coli* em alimentos e zaragatoas

Tabela 43 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Enterobacteriaceae* em alimentos e zaragatoas

Tabela 44 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Estafilococos coagulase-positiva em alimentos e zaragatoas

Tabela 45 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Bactérias sulfito-redutoras em alimentos e zaragatoas

Tabela 46 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Clostridium perfringens* em alimentos e zaragatoas

Tabela 47 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Salmonella sp.* em alimentos e zaragatoas

Tabela 48 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Bolores e leveduras em alimentos e zaragatoas

Tabela 49 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Bacillus cereus* em alimentos e zaragatoas

Tabela 50 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* em alimentos e zaragatoas

Tabela 51 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Microrganismos psicotróficos em alimentos

Tabela 52 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados nas análises a amostras de ar

Tabela 53 – Temperaturas e tempos mais comuns para as amostras de ar

Tabela 54 – Interpretação dos tubos TSI

Tabela 55 – Resultado de uma água de consumo

Tabela 56 - Resultado de uma água de consumo

Tabela 57 – Resultado de uma água de piscina

Tabela 58 – Resultado de uma água para identificação de *Legionella sp.*

Tabela 59 – Resultado de uma água para identificação *Mycobacterium sp.*

Tabela 60 – Interpretação dos tubos TSI

Tabela 61 – Resultado de uma refeição pronta a comer

Tabela 62 – Resultado de uma refeição pronta a comer

Tabela 63 – Resultados para uma refeição pronta a comer

Tabela 64 - Resultados para um produto de pastelaria

Tabela 65 – Resultado de uma zaragatoa de superfície

Tabela 66 – Resultado de uma zaragatoa de manipulador

Tabela 67 – Resultados de uma amostra de ar interior

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PCA - Plate Count Agar

ufc - unidades formadoras de colónias

T – temperatura

MR'S - Materiais de Referência

TENC - Trabalho de Ensaio Não Conforme

APT – água peptonada tamponada

CN - Pseudomonas Agar

CCA - Chromogenic Coliform Agar

MSA - Manitol Salt Agar

SB + TTC - Slanetz and Bartley

BEA - Bile Esculina Agar

m-CP- Membrane Clostridium Perfringens

TSC – Tryptose Sulfite Cycloserine

VRBL - Violet Red Bile Lactose

VRBG - Violet Red Bile Glucose

TBX – Tryptone Bile Agar com X-Glucuronide

BP - Baird Parker

DRBC - Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol

XLD – Xylose lysine deoxycholate

VB - Brilliant Green Agar (verde brilhante)

MKTT - Muller Kauffman Tetracionato

RVS - Rappaport Vassilidis Soja

MEA-MaltExtractAgar

ENQUADRAMENTO

A água é um recurso essencial à vida, sendo fundamental para o bem-estar da humanidade e para a sobrevivência e a manutenção das funções e integridade dos ecossistemas, ou seja, a água no ambiente. Na cobertura adequada para os usos domésticos, a água é indispensável à sobrevivência e saúde das populações e constitui um fator determinante do saneamento básico.

A análise de alimentos tendo como objetivo detetar a presença, tipo e teor de microrganismos e/ou seus produtos, constitui uma área importante da Microbiologia Alimentar.

Na indústria alimentar, a higiene e o rigor, são os seus principais requisitos e nesta indústria os microrganismos ocupam um lugar de destaque, pelas boas e más razões.

O controlo microbiológico de qualidade, em relação aos microrganismos utilizados, e as regras de higiene obrigatórias por lei, como objetivo de evitar contaminantes.

A empresa

A empresa MicroChem é um laboratório acreditado com atividades microbiológicas e químicas focadas em diversas áreas, tais como, análises de águas, alimentos, ar, ambiente e resíduos, higiene de processos, hospitalares e industriais.

O laboratório foi fundado no ano de 2006 tendo iniciado a sua atividade na área das análises alimentares, ambientais e técnicas. Como garantia de credibilidade dos resultados emitidos, foram atribuídas ao laboratório as seguintes credenciais:

- Acreditação do Laboratório pelo IPAC- Instituto Português de Acreditação
- Aptidão concedida pelo ERSAR - Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
- Membro ativo em Comissões Técnicas de normalização nacionais (IPQ) e internacionais (ISO)
- Estatuto de fornecedor em plataforma eletrónica para a contratação do setor público e mercado privado

O Laboratório MicroChem presta um acompanhamento personalizado, nomeadamente em:

- Seleção de análises
- Interpretação de resultados
- Esclarecimentos e aconselhamentos técnicos
- Entrega de Relatórios de Ensaio *on-line* em tempo real
- Notificação antecipada de incumprimentos dos ensaios
- Elaboração de planos de controlo de qualidade analítico e planos de vigilância sanitária
- Informação atualizada de legislação, recomendações e requisitos de entidades reguladoras

Os ensaios e as análises que são efetuadas estão descritos nas tabelas seguintes, estando divididos pelas diferentes áreas:

Tabela 1 – Ensaios relativos à água

<u>Água</u>	Qualidade da água de abastecimento público
	Avaliação da água de poços ou furos
	Caracterização de água superficial e subterrânea
	Qualidade de água mineral natural (termal)
	Controlo de águas recreativas, piscina, jacuzi e SPA
	Qualidade de água engarrafada
	Qualidade de água balnear fluvial e costeira
	Controlo sanitário da água de redes prediais e públicas

Tabela 2 – Ensaios relativos ao ar

<u>Ar e Climatização</u>	Caracterização de emissões gasosas
	Qualidade microbiológica do ar ambiente (interior e exterior)
	Qualidade da água de torres de arrefecimento e refrigeração
	Identificação de espécies de bactérias e fungos
	Quantificação e identificação de espécies de <i>Legionella sp.</i>
	Ensaios em condensados de sistemas de climatização

Tabela 3 – Ensaios relativos ao ambiente e resíduos

<u>Ambiente e Resíduos</u>	Monitorização de lamas
	Monitorização de separador de hidrocarbonetos
	Avaliação de água residual
	Monitorização de lixiviados
	Caracterização da água de dragagens
	Avaliação de resíduos para aterro

Tabela 4 – Ensaios relativos a produtos alimentares

<u>Produtos Alimentares</u>	Controlo de produtos certificados
	Qualidade microbiológica e físico-química
	Ensaios de estabilidade e esterilidade
	Avaliação sensorial
	Estudo de validade
	Avaliação de contaminantes
	Avaliação de requisitos específicos para comercialização
	Composição centesimal e rotulagem

Tabela 5 – Ensaios relativos a higiene de processos

<u>Higiene de Processos</u>	Avaliação de superfícies com uso de zaragatoas
	Avaliação de manipuladores com o uso de zaragatoas
	Avaliação de utensílios com o uso de zaragatoas
	Validação de processos de higienização
	Validação de processos de segurança alimentar e HACCP

Tabela 6 – Ensaios relativos ao meio hospitalar

<u>Meio Hospitalar</u>	Avaliação de biocontaminação hospitalar
	Monitorização do plano de prevenção de risco (água, ar, superfícies)
	Avaliação de ambientes controlados

	Avaliação microbiológica e estimativa da população microbiana em dispositivos médicos
	Testes de esterilidade em consumíveis e dispositivos médicos
	Avaliação da segurança microbiológica de refeições

Tabela 7 – Ensaios relativos à indústria

<u>Indústria</u>	Avaliação da eficiência de anti-sépticos, desinfetantes e detergentes
	Testes de esterilidade
	Avaliação microbiológica de manipulados
	Testes microbiológicos em embalagens (sacos, filmes plásticos, bobines)

O laboratório:

O laboratório de microbiologia é constituído por três salas:

- A sala das amostras, onde se fazem todas as análises, encontrando-se a rampa de filtração, os banhos-maria e ainda a câmara de fluxo laminar que serve para criar áreas de trabalho estéreis para a manipulação de materiais biológicos ou estéreis que não possam sofrer contaminação do meio ambiente, garantindo a segurança da manipulação, sendo utilizada maioritariamente para colocar meio em placas para posterior armazenamento e para dar o choque com a luz UV, a trabalhos de ar encomendados pelos clientes, de forma a limpar a carga microbiana existente (ver Anexos 1,2,3 e 4);
- A sala das estufas que contém as cinco estufas de diferentes temperaturas e é também onde se efetuam as leituras e contagens das placas (ver Anexos 5 e 6);
- A sala de apoio onde se situa o computador para fazer todos os registos e também onde se realizam as provas de confirmação (ver Anexos 7 e 8).

Para além disso é também utilizada uma sala de equipamentos comuns que é amplamente usada pela Microbiologia e pela Química. Aqui são preparados todos os meios de cultura e pesados todos os reagentes necessários pois é onde se encontram as balanças, centesimal e analítica, e a bomba para distribuição de meio. É também aqui que se pesam os alimentos que se vão analisar uma vez que é onde está

colocado o *stomacher* que proporciona uma mistura e homogeneização rápida da amostra (ver Anexos 9 e 10).

Objetivo de estágio

O estágio teve como objectivo a execução de ensaios microbiológicos e actividades conexas nas áreas alimentar, ambiental e técnica, em contexto empresarial (laboral), tendo então sido feitas análises a águas, alimentos e zaragatoas.

O corpo desta dissertação encontra-se organizado da seguinte forma: inicialmente apresenta-se o enquadramento do relatório; em segundo lugar, é feita uma revisão bibliográfica com base na análise de livros; de seguida, apresenta-se a secção de material e métodos onde serão descritos todas as análises realizadas relativas aos microrganismos a identificar; sucedem-se os resultados que são obtidos para cada microrganismo e consequentes provas de confirmação, completando com os cálculos e exemplos de alguns resultados com a discussão dos mesmos; por fim, são expostas as principais conclusões.

REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS

ÁGUA

A água é considerada em parte como um produto e decorrem do seu uso alterações inevitáveis que devem ser controladas de forma integrada; deve ser garantida, quer a qualidade da água enquanto recurso, quer os aspetos ambientais e sanitários. Para cada uso da água é necessário definir as exigências relativas à sua qualidade, através da definição de parâmetros de qualidade e estabelecer os seus valores limites, tendo em conta os respetivos quadros normativos (Metcalf & Eddy, 2002).

É essencial estabelecer processos de monitorização, frequências de amostragem e análises da água em função dos perigos e riscos e de acordo com a legislação em vigor. Para além disso, é necessário estabelecer as metodologias analíticas de referência para a determinação de cada parâmetro de qualidade (Percival *et. al*, 2004).

Os quadros normativos são utilizados como suporte para o desenvolvimento do controlo de perigos e riscos sanitários, podendo variar com as características sociais, ambientais e económicas, as vias de exposição e a eficácia das medidas de controlo. Estes quadros normativos apresentam os valores limites paramétricos que definem a concentração de um constituinte que não representa um perigo significativo para a saúde dos utilizadores e as condições nas quais as ocorrências de exposição não são prováveis (Mendes, *et. al*, 2004). Através dos valores destes quadros, pode-se identificar se uma água se encontra conforme ou não conforme.

Os organismos de patogenicidade limitada ou não existente juntamente com organismos patogénicos podem ser considerados como indicadores de presença ou ausência dos mesmos, sendo utilizados como organismos indicadores de contaminação fecal. (Gerardi, *et. al*, 2004) Os indicadores mais utilizados são os coliformes totais e fecais, que incluem a *E.coli*, enterococos fecais, microrganismos anaeróbios esporulados redutores de sulfito como o *C. perfringens*, microrganismos a 22 °C e 36 °C (indicadores da matéria orgânica facilmente biodegradável) e as *Pseudomonas aeruginosa*. (Gerardi, *et. al*, 2004)

Metodologias analíticas

Para a análise de águas podem ser utilizadas várias técnicas, sendo a técnica de filtração em membrana a metodologia de referência para a pesquisa e quantificação dos microrganismos indicadores utilizados na avaliação da qualidade da água. Esta técnica consiste na filtração de uma amostra de água através de uma membrana de nitrocelulose com tamanhos de poros variáveis, posteriormente colocada na superfície de meios de cultura sólidos seletivos para o grupo de microrganismos que se pretende qualificar. (Mendes, *et. al*, 2004)

Existe outro método para a detecção de coliformes e *E. coli* sendo o teste de presença-ausência. Este método tem por base uma antiga técnica de fermentação em tubos múltiplos uma vez que se baseia no pressuposto que os organismos coliformes não deverão estar presentes na água. (Mendes, *et. al*, 2004)

ALIMENTOS

Comportamento dos microrganismos nos alimentos

Os alimentos e os microrganismos desenvolveram desde sempre uma interessante associação, uma vez que não apresentam apenas um valor nutricional importante para quem os consome, as são, muitas vezes, um meio de cultura ideal para o desenvolvimento microbiano. Dependendo do tipo de microrganismo presente, da multiplicação microbiana pode resultar deterioração dos alimentos ou risco microbiológico para a saúde humana. Os alimentos podem ser um veículo de transmissão de doenças, pelo que a detecção e controlo, quer dos microrganismos patogénicos, quer dos microrganismos de alteração, são importantes aspetos da microbiologia dos alimentos (Araújo, 1997).

Parâmetros intrínsecos e extrínsecos que afetam os alimentos

Existem fatores que afetam o desenvolvimento microbiano nos alimentos, podendo estes ser classificados como intrínsecos ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos correspondem a todos os que se encontram relacionados com o alimento em si e incluem pH, teor de humidade, atividade da água, potencial de oxidação-redução, disponibilidade de nutrientes, constituintes microbianos e estruturas

biológicas; enquanto que os fatores extrínsecos dizem respeito às características externas ao alimento como as condições ambientais e de armazenagem (temperatura, humidade e presença e concentração de oxigénio e dióxido de carbono). (INSA, 2006)

Pesquisa, identificação e quantificação de microrganismos nos alimentos

A questão da distribuição dos microrganismos nos alimentos ser irregular exige que sejam elaborados corretos planos de amostragem, o que nem sempre é fácil. Outro problema adicional consiste no manuseamento e transporte das amostras ao laboratório. É fundamental que sejam evitadas, quer a multiplicação microbiana, que iria dar uma imagem errada sobre o alimento, quer a distribuição de parte da flora, o que sugeriria estarmos perante uma situação mais favorável. Por isso as amostras devem ser mantidas, até ao momento de análise, a cerca de 4°C por um período não superior a 24 horas (Prescott, *et. al*, 1996).

Os métodos microbiológicos convencionais que assentam nas contagens microbianas, são morosos, trabalhosos e exigem longos períodos de tempo até obtenção de resposta. Contudo, tendo em vista evitar surtos de toxinfecção alimentar há necessidade de detetar rapidamente os germes patogénicos, sendo atualmente a técnica de PCR – *Polimerase Chain Reaction*, a mais utilizada (Jay, 1996).

ZARAGATOAS

Avaliação microbiológica de superfícies

As superfícies que contactam os alimentos devem ser mantidas em perfeitas condições de higiene. Os métodos mais usados para a análise microbiológica de superfícies utilizam zaragatoas e placas de contacto. Estas últimas são placas de Petri especiais, totalmente cheias com um meio de cultura adequado, de tal forma que, quando a placa é invertida, o meio de cultura contacta com a superfície em estudo. O método com zaragatoa é relativamente fácil e rápido de usar, sendo feito um esfregaço em forma de ziguezague sobre a superfície a ser analisada; o mesmo acontece com os manipuladores de alimentos e respetivos utensílios. (Prescott, *et. al*, 1996)

SEGURANÇA ALIMENTAR MICROBIOLÓGICA

Todas as pessoas têm o direito de esperar que todos os alimentos que consomem sejam inócuos e aptos para consumo. Os riscos originados pelos perigos microbiológicos constituem um problema sério e atual para a saúde humana. Contudo, o facto de serem seguidas boas práticas de fabrico não determina, por si só, que os alimentos produzidos estejam isentos de microrganismos patogénicos. A meta a atingir será a obtenção de alimentos com o mais baixo teor possível de microrganismos (Araújo, 1997).

O controlo microbiológico tradicional de alimentos assenta na análise de matérias-primas e produtos finais. Para produzir alimentos seguros que não ponham em risco a saúde do consumidor, é necessário implementar sistemas de controlo eficazes, ao longo de toda a cadeia de fabrico e distribuição. Segundo a Organização Mundial de Comércio, é da responsabilidade dos produtores de alimentos a implementação de boas práticas e a aplicação dos princípios do sistema de análise de perigos e pontos de controlo críticos – HACCP (Codex Alimentarius Commission).

MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

A quantificação do crescimento de microrganismos unicelulares assenta, basicamente, na utilização de metodologias para a determinação de variações no número ou massa de células ao longo do tempo. A determinação do número de células pode ser obtida por métodos diretos de contagem ao microscópio ou em contadores eletrónicos e métodos indiretos de contagem de células viáveis (Slater, 1985).

Nos métodos diretos de contagem determina-se o número total de células, não sendo possível distinguir células viáveis de células não viáveis ou dormentes. A contagem ao microscópio requer uma câmara de contagem que consiste numa lâmina de vidro com um quadriculado gravado que permite definir uma determinada área de contagem. Uma outra forma de contagem baseia-se na utilização de contadores eletrónicos de partículas que se baseia na medição da alteração da condutividade elétrica da solução provocada pela passagem de uma célula entre dois elétrodos (Prescott, *et. al*, 2004).

Para a determinação pelo método indireto de contagem em placa (que é o método realizado na laboratório), espalha-se, pelo método de espalhamento, ou incorpora-se, pelo método de incorporação, um volume definido da suspensão celular convenientemente diluída de forma a originar entre 30-300 colónias por placa. A contagem de colónias é realizada após incubação a uma temperatura adequada e baseia-se no princípio que uma célula viável dá origem a uma colónia. Uma vez que existe a probabilidade de duas células muito próximas ou de agregados de células poderem originar uma colónia, a contagem é expressa em unidades formadoras de colónias (ufc). Esta técnica apresenta várias desvantagens, nomeadamente a morosidade causada essencialmente por um tempo de incubação de pelo menos 24-48 horas e o facto de só se detetarem colónias dos microrganismos para os quais as condições de cultura forem adequadas (Oliver, 2005).

TABELAS NORMATIVAS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

Alguns microrganismos contribuem de forma benéfica no processamento, na segurança e na qualidade de certos produtos alimentares. Contudo, muitos microrganismos estão envolvidos em processos que causam efeitos indesejáveis nos próprios alimentos, ou na saúde dos consumidores, levando quer à deterioração, quer à ocorrência de doenças de origem alimentar. A vigilância microbiológica das águas, dos alimentos, das pessoas e das superfícies em que se trabalha, corresponde a uma área de grande interesse em Saúde Pública, tendo por objectivo assegurar a inocuidade e a salubridade para actuar na prevenção das doenças. (M. Isabel Santos, Cristina Correia, M. Isabel Campos Cunha, M. Margarida Saraiva, M. Rosário Novais-Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – INSA; Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – CSAN).

Relativamente às diferentes águas, os valores tabelados que são seguidos pelo laboratório estão descritos nas tabelas seguintes:

- Para Águas de Consumo

Tabela 8 – Valores tabelados para as águas de consumo

Decreto-Lei nº 306/2007			
	Método	Valor recomendado	Valor paramétrico
Microrganismos 36°C	ISO 6222:1999	20	S/ alteração anormal
Microrganismos 22°C	ISO 6222:1999	100	S/ alteração anormal
Bactérias coliformes	ISO/CD 9308-1:2010	-	0
<i>Escherichia coli</i>	ISO/CD 9308-1:2010	-	0
Enterococos intestinais	ISO 7899-2:2000	-	0
<i>Clostridium perfringens</i>	EPA 600:1996	-	0

- Para Águas de Piscina

Tabela 9 – Valores tabelados para as águas de piscina

Decreto Regulamentar nº 5/97 / Direção Geral de Saúde			
	Método	Valor recomendado	Valor limite
Microrganismos 36°C	ISO 6222:1999	100	(1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ISO 16266:2006	-	0
Bactérias coliformes	ISO/CD 9308-1:2010	0	10
<i>Escherichia coli</i>	ISO/CD 9308-1:2010	-	0
Enterococos intestinais	ISO 7899-2:2000	-	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	NP 4343:1998	0	(2)
Total de <i>Staphylococcus aureus</i>	NP 4343:1998	20	(1)

(1) – O Valor recomendado pode ser ultrapassado uma vez por época de abertura ao público

(2) – O Valor limite pode ser 0/100 mL em 90% das amostras

- Para Águas Termais

Tabela 10 – Valores tabelados para as águas termais

Portaria 1220/2000			
	Método	Banhos e Duches	Captção, Ingestão, Contacto c/ mucosas
Microrganismos 36°C	ISO 6222:1999	20	5
Microrganismos 22°C	ISO 6222:1999	100	20
Bactérias coliformes	ISO/CD 9308-1:2010	0	0
<i>Escherichia coli</i>	ISO/CD 9308-1:2010	0	0
Enterococos intestinais	ISO 7899-2:2000	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ISO 16266:2006	0	0
Anaeróbios sulfito-redutores	ISO 6461-2:1986	0	0

- Para *Legionella sp.*

Tabela 11 – Valores tabelados para *Legionella sp*

Matriz	Método	Legislação e Valores		
Água Termal	ISO 11731:1998	Portaria 1220/2000		
		<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella sp.</i> (outras estirpes)	
		0	100	
Água Recreativa	ISO 11731-2:2004	Direção Geral de Saúde		
		Sob controlo	Repetir colheita	Encerrar e tratar
		<100	≥100 e ≤1000	>1000
Água tratada e não tratada	ISO 11731-2:2004 ou ISO 11731:1998	Decreto-Lei nº 79/2006		
		Concentração máxima de referência		
		100		

- Para Águas Balneares

Tabela 12 – Valores tabelados para as águas balneares

Diretiva 76/160/CE			
	Método	Guia	Imperativo
Coliformes totais	ISO/CD 9308-1:2010	500	10000
<i>Escherichia coli</i>	ISO/CD 9308-1:2010	100	2000
Enterococos intestinais	ISO 7899-2:2000	100	-
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6340:1995	-	0

Tabela 13 – Valores tabelados para as águas balneares

Anexo XV – Decreto-Lei nº 236/98			
	Método	VMR	VMA
Coliformes totais	ISO/CD 9308-1:2010	500	10000
Coliformes fecais	ISO/CD 9308-1:2010	100	2000
Enterococos intestinais	ISO 7899-2:2000	100	-

VMR – Valor Máximo Recomendável

VMA – Valor Máximo Admissível

- Para Águas de Rega

Tabela 14 – Valores tabelados para as águas de rega

Anexo XV – Decreto-Lei nº 236/98			
	Método	VMR	VMA
Coliformes fecais	ISO/CD 9308-1:2010	100	-

VMR – Valor Máximo Recomendável

VMA – Valor Máximo Admissível

Relativamente aos alimentos, os valores tabelados que são seguidos pelo laboratório estão descritos nas tabelas seguintes:

- Valores Guia – Instituto Ricardo Jorge para Pratos confeccionados e sobremesas

Tabela 15 – Grupos de alimentos designados pelo INSA

Grupo	Produto	Exemplos
Grupo 1	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
Grupo 2	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
Grupo 3	Saladas/ Vegetais/Frutos crus	Alface Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada

Tabela 16 – Valores tabelados para os alimentos do Grupo 1 segundo o INSA

Valores Guia INSA – Grupo 1					
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória	Inaceitável
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	$\leq 10^2$	$\leq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	N.A.
Bactérias coliformes	ISO 4832:2006	≤ 10	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	N.A
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	< 10	N.A	≥ 10	N.A
Estafilococos coagulase-positiva	ISO 6888-1:1999	$< 10^2$	N.A	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-	Presente
Bolores	ISO 21527-1:2008	≤ 10	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	(1)
Leveduras	ISO 21527-1:2008	$\leq 10^2$	$> 10 \leq 10^4$	$> 10^4$	N.A

(1) – especificado caso a caso

N.A. – não aplicável

Tabela 17 – Valores tabelados para os alimentos do Grupo 2 segundo o INSA

Valores Guia INSA – Grupo 2					
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória	Inaceitável
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	$\leq 10^3$	$\leq 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$	N.A.
Bactérias coliformes	ISO 4832:2006	≤ 10	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3$	N.A
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	< 10	N.A	≥ 10	N.A
Estafilococos coagulase-positiva	ISO 6888-1:1999	$< 10^2$	N.A	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-	Presente
Bolores	ISO 21527-1:2008	≤ 10	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	(1)
Leveduras	ISO 21527-1:2008	$\leq 10^2$	$> 10 \leq 10^4$	$> 10^4$	N.A

(1) – especificado caso a caso

N.A. – não aplicável

Tabela 18 – Valores tabelados para os alimentos do Grupo 3 segundo o INSA

Valores Guia INSA – Grupo 3					
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória	Inaceitável
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	$\leq 10^4$	$\leq 10^4 \leq 10^6$	$> 10^6$	N.A.
Bactérias coliformes	ISO 4832:2006	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	N.A
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	≤ 10	$> 10 < 10^2$	$\geq 10^2$	N.A
Estafilococos coagulase-positiva	ISO 6888-1:1999	$< 10^2$	N.A	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-	Presente
Bolores	ISO 21527-1:2008	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3$	(1)
Leveduras	ISO 21527-1:2008	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^5$	$> 10^5$	N.A

(1) – especificado caso a caso

N.A. – não aplicável

- Para Padaria / Pastelaria

Tabela 19 – Valores tabelados para alimentos de padaria/pastelaria

Portaria nº65/90				
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	$\leq 1,0 \times 10^5$	$\leq 1,0 \times 10^6$	$> 1,0 \times 10^6$
Bactérias coliformes	ISO 4832:2006	$\leq 1,0 \times 10^3$	$\leq 1,0 \times 10^4$	$> 1,0 \times 10^4$
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	$\leq 1,0 \times 10^1$	$\leq 1,0 \times 10^2$	$> 1,0 \times 10^2$
Estafilococos coagulase-positiva	ISO 6888-1:1999	$\leq 1,0 \times 10^2$	$\leq 1,0 \times 10^3$	$> 1,0 \times 10^3$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-
Bactérias sulfito-redutoras	ISO 15213:2003	$\leq 1,0 \times 10^1$	$\leq 1,0 \times 10^2$	$> 1,0 \times 10^2$
Bolores e Leveduras	ISO 21527-1:2008	$\leq 5,0 \times 10^2$	$\leq 5,0 \times 10^3$	$> 5,0 \times 10^3$

Tabela 20 – Valores tabelados para alimentos de padaria/pastelaria

Decreto-Lei nº41/2009			
	Método	Satisfatória	Não satisfatória
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	$\leq 1,0 \times 10^1$	$> 1,0 \times 10^2$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528:2004	$\leq 1,0 \times 10^1$	$> 1,0 \times 10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:2004	$\leq 1,0 \times 10^2$	-

- Produto Horto / Frutícula

Tabela 21 – Valores tabelados para alimentos horto/frutícula

Portaria nº65/90				
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	$> 10^3$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-

<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:2004	$\leq 10^2$	-	-
Bolores e Leveduras	ISO 21527-1:2008	-	-	-

- Preparados de carne

Tabela 22 – Valores tabelados para preparados de carne

Regulamento 1441/2007				
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	$< 5,0 \times 10^2$	$< 5,0 \times 10^3$	$\geq 5,0 \times 10^3$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	$\geq 1,0 \times 10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:2004	$< 1,0 \times 10^2$	-	-

- Carcaças de bovinos, ovinos, caprinos e equídeos

Tabela 23 – Valores tabelados para carcaças de bovinos, ovinos, caprinos e equídeos

Regulamento 1441/2007				
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	$< 3,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^4$	$\geq 1,0 \times 10^4$
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528:2004	$< 3,0 \times 10^1$	$< 3,0 \times 10^2$	$\geq 3,0 \times 10^2$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:2004	$< 1,0 \times 10^2$	-	$\geq 1,0 \times 10^4$

- Carcaças de suínos

Tabela 24 – Valores tabelados para carcaças de suínos

Regulamento 1441/2007				
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	$< 1,0 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^5$	$\geq 1,0 \times 10^5$
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528:2004	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^3$	$\geq 1,0 \times 10^3$

<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:2004	$<1,0 \times 10^2$	-	$\geq 1,0 \times 10^2$

- Carcaças de frangos e perús

Tabela 25 – Valores tabelados para carcaças de frango e peru

Regulamento 1441/2007				
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:2004	$<1,0 \times 10^2$	-	$\geq 1,0 \times 10^2$

- Carne picada e carne separada mecanicamente

Tabela 26 – Valores tabelados para carne picada e separada automaticamente

Regulamento 1441/2007				
	Método	Satisfatória	Aceitável	Não satisfatória
Microrganismos 30°C	ISO 4833:2003	$<5,0 \times 10^5$	$<5,0 \times 10^6$	$\geq 5,0 \times 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^2$	$\geq 5,0 \times 10^2$
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 6579:2002	Ausente	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:2004	$<1,0 \times 10^2$	-	$\geq 1,0 \times 10^2$

Relativamente às zaragoas de manipuladores, superfícies e utensílios os valores tabelados que são seguidos pelo laboratório estão descritos na tabela seguinte:

Tabela 27 – Valores tabelados para as zaragatoas de superfícies, manipuladores e utensílios

Recomendação INSA – Qualidade higiénica de superfícies limpas		
	Método	Valores limite
Microrganismos 30°C	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 4833:2003	$<1,0 \times 10^2$
Bactérias coliformes	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 4832:2006	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 16649-2:2001	Ausente
Estafilococos coagulase-positiva	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 6888-1:1999	Ausente
<i>Salmonella sp.</i>	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 6579:2002	Ausente
Bactérias sulfito-redutoras	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 15213:2003	Ausente
Bolores e Leveduras	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 21527-1:2008	Ausente
<i>Bacillus cereus</i>	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 7932:2004	Ausente
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 21528-2:2004	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 18593:2004 (8 e 9); ISO 11290-2:2004	Ausente

Por último, relativamente às zaragatoas para a qualidade do ar interior, os valores tabelados que são seguidos pelo laboratório estão descritos na tabela seguinte:

Tabela 28 – Valores tabelados para as zaragatoas de amostras de ar

Portaria 353-A		
	Método	Concentração máxima de referência
Bactérias 25°C / 37°C	EN 13098:2001	$<300 \text{ ufc} / \text{m}^3 + \text{valor médio no exterior}$
Fungos 25°C	EN 13098:2001	$< \text{ufc} / \text{m}^3 \text{ valor medido no exterior}$

MATERIAL E MÉTODOS

O controlo ambiental e a higienização no laboratório de Microbiologia são essenciais para o despiste de eventuais problemas a este nível, que possam influenciar a validade dos ensaios e dos resultados obtidos.

Antes de serem enumerados os ensaios e técnicas utilizados, é importante falar sobre as etapas do controlo de qualidade em ensaios de microbiologia, juntamente com a preparação dos meios de cultura.

Durante um exame microbiológico é especialmente importante que sejam isolados e enumerados apenas os microrganismos presentes na amostra, e que estes não contaminem o ambiente e consequentemente coloquem em risco o manipulador. Neste sentido, devem ser garantidas e aplicadas técnicas e metodologias de modo a evitar situações de contaminação cruzada e melhorar a performance do ensaio.

Higienização e Controlo Ambiental do laboratório de Microbiologia

O controlo ambiental é realizado de forma a observarmos a qualidade do ar interior e a higienização e desinfeção das superfícies de trabalho e equipamentos.

Materiais e Reagentes utilizados:

- Zaragatoas estéreis
- Placas de Petri
- Plate Count Agar, PCA
- Álcool 70%
- Água destilada

As regras para a higienização e limpeza são seguidas a partir do documento SMEWW 9020 B (9-4) e da NP 2079:1989.

Qualidade do Ar Interior:

A monitorização é feita mensalmente através da medição de bactérias existentes no ar e é realizada colocando durante aproximadamente 15 minutos, com

exceção da câmara de fluxo laminar em que a medição é realizada durante 30 minutos, placas de Petri de PCA expostas ao ar nos seguintes locais alternadamente:

- Sala de preparação das amostras: bancada da rampa de filtração – ponto fixo, bancada dos banhos, dentro da câmara de fluxo laminar – superfície de trabalho, parede lateral esquerda, parede lateral direita, parede do fundo, prateleira central do frigorífico;
- Sala das estufas: bancada de apoio, em cima das estufas, bancada das estufas;
- Sala das leituras: bancada do contador de colónias, bancada do microscópio, mesa de apoio;
- Sala dos equipamentos comuns (balanças): bancada das balanças, bancada do selador.

Por fim os requisitos necessários são os seguintes:

- As placas são incubadas invertidas a 22°C durante 7 dias e a 30°C durante 3 dias;
- O número de colónias em cada placa não deve exceder 15 ufc;
- Para valores entre 15 e 100 ufc realiza-se uma repetição, após uma nova limpeza e desinfecção;
- Se o número de colónias cumprir com o requisito (<15), deverá ser dada continuidade ao planeamento normal mas se o problema persistir o colaborador avisa a Responsável da Qualidade para abertura de um registo de Trabalho de Ensaio Não Conforme.

No caso da câmara de fluxo laminar o número de colónias na placa deve ser 0 ufc, enquanto no caso da sala dos equipamentos comuns, o número de colónias na placa deve ser <10 ufc.

Higienização e Desinfecção de Superfícies:

A monitorização é feita mensalmente, através da colheita com zaragatoa e posterior inoculação em PCA, após limpeza e desinfecção das superfícies de trabalho com desinfetante apropriado (tempo de atuação do desinfetante 15 minutos).

A medição é realizada colocando nos locais que já foram indicados acima para a Qualidade do Ar Interior, tendo exactamente os mesmos requisitos.

Higienização do laboratório e dos Equipamentos de Microbiologia:

A higienização é feita mensalmente, aos seguintes equipamentos, exceto aos banhos-maria onde a limpeza é feita semanalmente:

- câmara fluxo laminar
- banho-maria 3T
- banho-maria
- microondas 1
- microondas 2
- homogeneizador peristáltico
- micropipeta 10-100 µL
- micropipeta 100-1000 µL
- micropipeta 10-100 µL
- micropipeta 100-1000 µL
- micropipeta 10 mL
- estufa 36°C, 44°C, 30°C 25°C e 20°C
- contador de colónias
- congelador
- frigorífico

Cada equipamento deve ser limpo de acordo com as especificações do fabricante, normalmente a limpeza do equipamento é realizada com álcool a 70%, excepto a câmara de fluxo laminar que deve ser limpa com água destilada. O registo desta monitorização é efetuado em suporte informático pelos colaboradores do Laboratório de Microbiologia.

A higienização do laboratório de Microbiologia é feita mensalmente a todas as salas que o constituem (sala de execução das amostras, sala das estufas, sala das leituras e sala das balanças). Deve ser efetuada a higienização a fundo de todo o laboratório usando álcool a 70% nas bancadas e equipamentos, devem também ser limpas as portas, armários e vidros com detergente adequado e chão com detergente adequado e hipoclorito (lixívia).

No caso, da sala de equipamentos comuns (sala das balanças), devido ao facto de esta ser utilizada tanto pelo laboratório de Microbiologia (pesagem de amostras, preparação de meios e pesagem de reagentes) como pelo laboratório da físico-química, a higienização da sala (bancadas e equipamentos) deve ser feita após cada utilização com álcool a 70% e devidamente registada.

O registo da higienização do laboratório de Microbiologia é efetuado em suporte informático pelos colaboradores do Laboratório de Microbiologia; o registo da higienização da sala de equipamentos comuns (sala das balanças) é efetuado após cada utilização num registo em papel que se encontra na sala.

O material utilizado que depois segue para consequente lavagem e esterilização é colocado no “carrinho dos sujos” que está situado ao lado do carrinho que é utilizado para ir buscar material à câmara frigorífica (ver Anexo 11).

Controlo da Qualidade em ensaio de Microbiologia

Antes de serem enumerados os ensaios e técnicas utilizados, é importante falar sobre as etapas do controlo de qualidade em ensaios de microbiologia.

Segundo SMEWW 1020 B (12) e SMEWW 9020 B, ISO 8199 e ISO 11133, 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.

O branco representa a matriz (no caso dos alimentos – água peptonada tamponada; no caso das águas – água estéril; no caso do ar – o meio de cultura utilizado; no caso das zaragatoas – zaragatoa estéril) e é tratado da mesma forma que a amostra, no entanto, não contém os microrganismos em análise. As réplicas são a análise da amostra “n” vezes nas mesmas condições de análise.

Os controlos positivos e negativos têm como objetivo garantir a especificidade dos reagentes utilizados para um determinado microrganismo. 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. Os controlos negativos são normalmente utilizados em provas de confirmação, e apresentam um resultado inverso ao esperado do microrganismo em análise para determinada característica.

Para o controlo de qualidade externo são realizados ensaios interlaboratoriais, ou seja, amostras reais com ou sem o microrganismo alvo. Os ensaios são

executados do mesmo modo que as amostras de rotina e os resultados são enviados à entidade competente para serem comparados e avaliados. Cada laboratório recebe o seu relatório de desempenho, com a sua avaliação de forma a verificar se o método 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.

Controlo de Qualidade Interno dos Ensaios:

1- Materiais de Referência (MR'S)

- Os materiais de referência são introduzidos e processados na rotina mensalmente;
- O procedimento de preparação do material de referência é executado de acordo com as especificações técnicas do fornecedor
- Os resultados são registados e avaliados de acordo com as referências do fabricante (valor médio esperado e respetivos limites)

Os valores obtidos são utilizados como indicadores operacionais de todas as variáveis associadas ao ensaio, nomeadamente, a correta execução dos técnicos, o manuseamento adequado dos materiais e reagentes, a estabilidade dos equipamentos, a qualidade dos meios e reagentes, entre outros.

Os resultados não válidos servem de orientação para investigar a causa dessa avaliação, não tendo objetivo discriminatório no que diz respeito à rejeição de resultados.

Devem ser investigados resultados não válidos que ocorram consecutivamente por três vezes, com o objetivo de determinar possíveis erros (sistemáticos e/ou aleatórios). Neste caso é aberto um registo de Trabalho de Ensaio Não Conforme (TENC).

2- Controlos Positivos e Negativos

- O Controlo Positivo é executado sempre que seja necessário efetuar provas de confirmação (tem como objetivo verificar o estado dos reagentes utilizados nas

provas) ou para comparar o crescimento do microrganismo alvo num determinado meio de cultura;

- O Controlo Negativo é executado sempre que seja necessário efectuar provas de confirmação (servem para comparar as reacções de um microrganismo com determinada característica e outro sem a mesma);
- O Controlo Positivo é realizado com as estirpes dos Materiais de Referência.

3- Brancos

Os Brancos são ensaiados com o objetivo de avaliar as condições em que as análises são efetuadas e são preparados de acordo com a amostra, nomeadamente:

- Alimentos: água peptonada tamponada
- 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). A data de esterilização de cada Branco utilizado é registada na Lista de Trabalho de Microbiologia (Modelo 33 r00).
 - A água utilizada para realização deste Brancos e preparação de certos reagentes, deve ser controlada relativamente à condutividade (limite 25 µS cm⁻¹) e crescimento microbiano a 22 °C (limite 100 ufc/mL) em cada utilização (ponto 5.1.1 da norma ISO 8199/ponto 4.3.2 da norma ISO 11133);
 - Os valores obtidos devem ser registados no Modelo 34r00 – Controlo da Água Reagente Microbiologia;
 - Qualquer anomalia nestes valores é contactado o fornecedor para realização da manutenção do equipamento, de forma a averiguar o problema, até este ser resolvido
- Ar: meio de cultura utilizado (bactérias – Plate Count Agar com ciclohexamida; fungos – Malt Extract Agar com cloranfenicol);
- Zaragatoas: zaragatoa estéril.

São executados Ensaios em Branco semanalmente, sempre que o ensaio é executado e sempre que o valor do Ensaio em Branco for diferente de zero é necessário reavaliar as amostras executadas entre brancos:

- Se as amostras forem positivas é necessário repetir os ensaios caso esteja dentro do período de execução. Se não for possível repetir, é subtraído ao valor do ensaio, o valor do branco;
- Se as amostras forem negativas os resultados são considerados válidos.

4- Duplicados

São realizados semanalmente, sempre que o ensaio é executado e é feito para cada parâmetro analisado e diluição, caso se aplique.

Controlo de Qualidade Externo dos Ensaiois:

O Controlo de Qualidade Externo é avaliado pela participação em ensaios de comparação interlaboratorial, é feito pelo menos uma vez por ano para Microbiologia alimentar e de zaratogas e para Microbiologia das águas.

Execução de Amostras Contaminadas:

Para ensaios sem amostras de rotina positiva, são executados de 3 em 3 meses a realização de todo o ensaio com amostras naturalmente contaminadas ou artificialmente contaminadas (com materiais de referência). Estes ensaios têm como objetivo o apuramento da perícia relativamente à identificação de colónias suspeitas, execução de provas de confirmação e avaliação da totalidade dos passos do procedimento de ensaio.

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

Os meios de cultura são a formulação de substâncias em forma líquida, semi-sólida, ou sólida, com constituintes naturais e/ou sintéticos, que permitem a multiplicação (com ou sem inibição intencional de certos microrganismos), identificação e preservação da viabilidade de microrganismos.

Existem meios para diferentes finalidades (de transporte, preservação, suspensão, ressuscitação, pré-enriquecimento, enriquecimento, isolamento, diferenciais, caracterização, identificação, enumeração e confirmação) e devido à sua extrema importância na prática laboratorial corrente, o laboratório deve assegurar a qualidade e rastreabilidade de todos os meios de cultura que produz e utiliza.

A norma de referência fornece exemplos de testes de garantia da qualidade quantitativos e qualitativos. Qualquer um dos testes pode ser selecionado e não é obrigatória a execução de todos os testes. Cada lote deverá ser alvo de controlo de qualidade, com ensaios qualitativos ou quantitativos, sendo o lote a quantidade de meio homogêneo, rastreável, produzido num mesmo período de tempo, com qualidade consistente (6.4.1).

O controlo de qualidade bem como a frequência de execução definidos como mínimo aceitável dependem da extensão da preparação de cada meio. Meios prontos a utilizar são avaliados e aceites pelo desempenho discriminado no certificado de qualidade dos mesmos, cujo conteúdo deve compreender os requisitos e menções da norma de referência. Meios preparados por componentes individualizados (componente a componente) devem ter um controlo de qualidade mais extenso do que os meios preparados a partir de fórmulas completas. Em qualquer um destes dois últimos casos deve ser sempre avaliado o certificado de qualidade, cujo conteúdo deve compreender os requisitos e menções da norma de referência.

Os microrganismos utilizados nos controlos devem ser de estirpes referenciadas, contudo estirpes isoladas pelo Laboratório também podem ser utilizadas (5.2).

1-Critérios de Aceitação dos Meios de Cultura e Reagentes para Preparação de Meios

Para cada lote é necessário verificar e registar a identificação do produto, integridade da embalagem e acondicionamento, data de validade, documentação fornecida (ex: certificado de qualidade) e data de receção. Caso se verifique alguma anomalia tem de ser comunicado ao fornecedor do meio, para que este reponha o mesmo e comunique ao fabricante.

2-Armazenamento do Produto Desidratado

Para todos os meios devem ser seguidas as instruções do fabricante. Os meios desidratados são armazenados num local fresco, seco e ao abrigo da luz, (ver Anexo 12), e deve ser sempre aplicada a regra do “first in-first out” (os primeiros a entrar são os primeiros a ser utilizados).

Os meios desidratados que, após primeira abertura, apresentem alterações significativas (cor, homogeneidade, humidade, etc) devem ser descartados.

3-Preparação Laboratorial de Meios

Sempre que é aberto um frasco de meio desidratado deve ser registada a data de início de uso e a preparação dos meios deve respeitar as instruções do fabricante.

Na preparação a água utilizada é sempre avaliada (ver Anexo 13). São verificadas e registadas a condutividade (requisito: até 25 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C) e a contaminação microbiana (requisito <102 ufc/mL). A contaminação microbiana é avaliada segundo ISO 6222 (incubação a 22±1°C por 68±4h).

A quantidade de produto desidratado é pesado (com cuidado para não inalar o pó) e reidratado, sendo os meios dissolvidos e preparados de acordo com as indicações do fabricante. Os meios são então distribuídos para os recipientes finais (frascos ou tubos) de modo a ficarem cheios até 80% da capacidade total. As placas de petri devem ser distribuídas com cerca de 15 mL de meio. Quando o meio é para ser guardado em frascos, é utilizada a bomba para ser facilitada a sua distribuição (ver Anexo 10).

Após a preparação e antes do armazenamento são efetuados controlos de modo a garantir a qualidade e integridade dos meios colocados a uso e são registados no registo do controlo dos meios de cultura todos os dados relativos ao meio preparado, nomeadamente designação, 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 técnico responsável.

Todos os meios são preparados no laboratório com exceção de alguns que são previamente encomendados já prontos, como é o caso do meio para a *Listeria monocytogenes* (OCLA) que vem em frascos para serem fundidos na altura de uso, sendo adicionado o suplemento, do meio para a *Legionella sp.* (BCYE ou GVPC) e para as suas provas de confirmação (Columbia 5% agar) e do meio para *Bacillus*

cereus (MYP) que vem em placas já preparadas, dos tubos Lowenstein com meio sólido para *Mycobacterium* e dos tubos TSI de meio sólido para as provas de confirmação de *Salmonella*. As soluções de pH 2.2 e Salina de Page que são utilizadas nas análises para a quantificação de *Legionella* são também preparadas no laboratório. A sua elaboração está descrita nos Anexos 12 e 13.

As tabelas que indicam o controlo de qualidade dos meios e a sua preparação estão descritas nos Anexos 14, 15, 16 e 17 respetivamente.

4-Esterilização dos meios

A esterilização, quando aplicável, é efetuada por calor húmido, em autoclave, a 121°C durante 15 minutos (ver Anexo18). O controlo da temperatura medida no interior do autoclave (termómetro de máxima) e o tempo de esterilização são efetuados para cada lote preparado e registados no registo do controlo dos meios de cultura.

5-Controlo de Qualidade e Avaliação de Conformidade

Tipo de testes:

- **Esterilidade**, como garantia de inexistência de contaminação microbiológica:
 - qualitativo, para meios utilizados em ensaios de quantificação/ enumeração e pesquisa
- **Produtividade**, como garantia da taxa de recuperação do microrganismo alvo:
 - quantitativo, para meios utilizados em ensaios de quantificação/ enumeração
 - qualitativo, para meios utilizados em ensaios de pesquisa
- **Seletividade**, como garantia de inibição do microrganismo não alvo:
 - qualitativo, para meios utilizados em ensaios de quantificação/ enumeração e pesquisa
- **Especificidade**, como garantia de que as características do microrganismo alvo são visualmente diferentes do microrganismo não alvo (com capacidade de crescimento no meio de cultura):

- qualitativo, para meios utilizados em ensaios de quantificação/enumeração e pesquisa
- **pH**, como garantia da verificação da especificação do meio preparado:
 - quantitativo, para meios utilizados em ensaios de quantificação/enumeração e pesquisa
- **Cor e consistência**, como garantia de verificação das características visuais comuns e expectáveis:
 - qualitativo (objetivo) para todos os meios

6-Controlo de Esterilidade (ausência de contaminação microbiológica)

A incubação deve ser feita à devida temperatura e durante o devido tempo, 1 placa/tubo de meio sem qualquer inóculo, de modo a verificar a ausência de crescimento. Sempre que ocorrer crescimento microbiano o meio é rejeitado

O controlo de esterilidade é registado no registo do controlo dos meios de cultura em pelo menos 1 placa/ tubo/ frasco por cada 100 unidades.

7-Produtividade (taxa de recuperação do microrganismo)

A estirpe de trabalho deve ser inoculada no meio a testar e no meio de cultura de referência (TSA ou outro especificado). O valor de colónias em TSA deve cumprir com os níveis de inóculo do meio a testar (normalmente 100 ufc).

As placas devem ser incubadas à mesma temperatura e durante o mesmo tempo e deve ser calculado o rácio entre a contagem obtida no meio a testar e a contagem obtida no TSA:

$$Pr = [\text{ufc meio teste} / \text{ufc TSA}]$$

Os critérios de produtividade devem cumprir com o critério de cada meio, sendo registada sempre no registo do controlo dos meios de cultura. Sempre que $Pr > 1.4$ deve ser investigado e identificado o motivo, e se não cumprir com o requisito o meio é rejeitado.

8-Selektividade (nível de inibição do microrganismo não alvo – “controlo negativo”)

Para a selectividade, é inoculado 1 placa/tubo de meio com o microrganismo não alvo (inibido), de modo a verificar a ausência de crescimento do microrganismo não alvo (inibido) e registar no registo do controlo dos meios de cultura.

9-Especificidade (avaliação de características do microrganismo alvo e não alvo – “controlo positivo”)

Para a especificidade, é inoculado 1 placa/tubo de meio com o microrganismo alvo e 1 placa/tubo de meio com o microrganismo não alvo (com capacidade de crescer no meio) e são incubados à devida temperatura e durante o devido tempo.

O crescimento característico do microrganismo alvo é verificado e registado no registo do controlo dos meios de cultura, tal como acontece com o crescimento não característico do microrganismo não alvo. Sempre que não estiverem reunidas as condições expectáveis o meio é rejeitado.

10-Controlo de pH

A medição de pH é efetuada após a esterilização. Caso seja necessário, utilizar NaOH 1M ou HCl 1M para efetuar as devidas correcções.

A calibração do equipamento de pH é efetuada na 1ª utilização da semana. Nas medições seguintes é verificado o estado de calibração com os padrões de controlo.

O pH e a temperatura são registados no registo do controlo dos meios de cultura e sempre que o valor de pH tiver um erro grosseiro, sem possibilidade de acerto com NaOH, HCl, o meio é rejeitado.

11-Armazenamento dos meios preparados e preparação para uso

O tempo de prateleira e as condições de armazenamento são variáveis e devem ser definidas de acordo com os respetivos documentos normativos, quando existentes. Na ausência desta informação são consideradas as seguintes condições gerais:

- temperatura de refrigeração ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$)
- duração de 2 a 4 semanas para meios em placa
- duração de 3 a 6 meses para meios em frascos e tubos

Quando o prazo de validade dos meios é ultrapassado estes são rejeitados e os meios com adição de suplementos são utilizados no próprio dia de preparação/liquefacção.

A preparação para uso na rotina é efetuada pela fusão em microondas ou em banho-maria (ver Anexos 1 e 2) e de modo a evitar o sobreaquecimento e variações térmicas abruptas, os meios a fundir em microondas são previamente colocados em banho-maria, após serem retirados da câmara frigorífica (ver Anexos 19 e 20).

Após a fusão em microondas, os meios devem repousar por 2 minutos antes de serem colocados em banho-maria, onde são mantidos a 46°C durante a sua utilização.

12-Codificação

Todos os meios devem guardados e rotulados indicando sempre identificação do meio (sigla), lote interno e prazo de validade ou data de distribuição.

Como foi dito anteriormente, vão ser agora abordadas as técnicas e análises efetuadas às águas, alimentos e zaragatoas e amostras de ar.

1 – ÁGUAS

Conceitos Gerais de Execução de Amostras de Águas (ISO 8199 e ISO 19458):

No caso das águas devem-se manusear as amostras em condições de assepsia e agitar durante alguns segundos de modo a que os microrganismos fiquem distribuídos uniformemente.

No caso de ser necessário quantificar o microrganismo alvo, devem ser preparadas diluições transferindo um volume (mL) da amostra para tubos de ensaio

cujas quantidades de diluente sejam 9x volume de inóculo (ex: pipetar 1mL de amostra para 9 mL de diluente) e deve ser agitado no vórtex durante 5 segundos.

Relativamente à sementeira, de acordo com a norma, deve ser utilizada uma das seguintes técnicas:

- **Incorporação:** pipetar o volume de inóculo (normalmente 1mL) para a placa de Petri e incorporar o meio de cultura (12 a 15mL) com movimentos rotativos e por fim deixar solidificar.
- **Espalhamento:** pipetar o volume de inóculo (normalmente 0,1mL) para a placa de Petri e incorporar com um espalhador em movimentos giratórios.
- **Filtração em membrana:** filtrar um volume de amostra (de acordo com o tipo de matriz) e colocar o filtro no meio de cultura, com a face onde ficou retido o concentrado virado para cima. O filtro deve ficar com toda a área de filtração sobre o meio de cultura pelo que devem ser utilizadas placas com diâmetro adequado, que garantam esta condição.

Após terminar o período de incubação, as placas devem ser examinadas com a maior brevidade. Se tal não for possível, devem ser refrigeradas a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, por um período não superior a 48h.

Para realizar as diversas análises às águas, é necessário saber quais as matrizes e as suas especificações, que segundo o documento OEC 021 do IPAC são as seguintes:

- Águas de Consumo que inclui águas tratadas (produto final ou em diferentes fases do tratamento) e não tratadas, podendo ser:
 - água de rede pública; água quente/fria sanitária
 - água de poço; água quente/fria sanitária
 - água de mina; água quente/fria sanitária
 - água de furo; água quente/fria sanitária
 - água da rede do edifício/hospitalar; água quente/fria sanitária

As águas de consumo são divididas, internamente, em três grupos, consoante os microrganismos que se pretendem analisar:

- R1 para analisar *E. Coli* e bactérias coliformes
- R1 + R2 para analisar microrganismos a 22°C e 36°C , *E. Coli* e bactérias coliformes e *Clostridium perfringens*

- R1 + R2 + Inspeção (Kit) para analisar microrganismos a 22°C e 36°C, *E. Coli* e bactérias coliformes, *Clostridium perfringens* e Enterococos
- Água Mineral Natural e de Nascente que são águas de consumo engarrafadas que apresentam características químicas próprias da sua natureza geológica, que não cumprem com as características químicas do DL 306/2007, sendo:
 - água engarrafada
 - água de fontenário (junto a captações características)
- Águas Naturais Doces que inclui:
 - águas superficiais (rios, lagos, albufeiras)
 - águas subterrâneas (poços, furos, nascentes)
 - águas termais
 - águas balneares
 - águas pluviais
- Águas Naturais Salinas que inclui:
 - águas marinhas
 - águas de transição
 - águas costeiras
 - águas balneares
- Águas de Processo, que são águas artificiais, ou seja, sofrem modificação de águas naturais por processos de tratamento: condensação, evaporação, osmotização, filtração, etc., podendo ser:
 - águas de caldeiras
 - águas de torres de refrigeração
 - águas de hemodiálise
 - águas para uso industrial
- Águas de Piscina que são referentes a águas em constante processamento tratamento e desinfecção, podendo ser:
 - águas para fins recreativos e desportivos (Piscinas de Ginásios e Municipais)
 - águas de hidromassagem (Jacuzzis)
 - águas para fins recreativos e terapêuticos (Piscinas de termas)
 - águas para fins terapêuticos e de reabilitação (Piscinas de hidroterapia e fisioterapia)
 - águas para fins recreativos (Parques aquáticos; outros que não se enquadrem nos anteriores).

De seguida vão ser enumerados os diversos microrganismos que se querem analisar, juntamente com o seu modo de execução, relativamente às águas.

Para todos os ensaios é necessário marcar as placas de Petri com o nº interno, data, identificação do meio de cultura e temperatura de incubação.

1.1-Microrganismos a 22°C e 36°C (ISO 6222:1999):

As águas contêm uma variedade de microrganismos que derivam de diversas fontes, como o solo e as plantas. A má qualidade de uma água utilizada para consumo pode constituir um problema de saúde pública. Uma estimativa da quantidade de microrganismos presentes numa água permite obter informação útil sobre a sua variação, permitindo assim vigiar a qualidade da água. 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) permite avaliar a eficiência dos tratamentos a que as águas estão sujeitas.

Este procedimento especifica a enumeração de microrganismos a 36°C e a 22°C. É aplicado a Águas de consumo, Naturais doces: superficiais, subterrâneas, termais e balneares, e Processo: caldeiras, torres de refrigeração e uso industrial. É de igual modo aplicável a água engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos.

Tabela 29 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de microrganismos a 36°C e 22°C em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 36±1°C Estufa a 22±2°C	Plate count agar, PCA
Pipetas	Banho-maria [46°C] Contador de colónias	

A amostra é inoculada directamente. As placas são incubadas em aerobiose a 36°C durante 24 ou 48 horas e a 22°C durante 72 horas.

As leituras são efetuadas em todas as placas com colónias.

1.2-*Escherichia coli* e Bactérias coliformes (ISO 9308-1:2014):

A presença e resistência da contaminação fecal são um factor importante na determinação da qualidade da água e do risco de infecção que representa para a saúde humana. A avaliação da *Escherichia coli* fornece o melhor indicador de contaminação fecal em águas. No entanto, esta é mais sensível aos tratamentos de desinfecção do que os vírus entéricos e os protozoários. A avaliação de Bactérias coliformes é de mais difícil interpretação, pois algumas habitam no solo e à superfície de águas frescas, nem sempre são de origem fecal. A presença de coliformes funciona ainda como um indicador de possíveis falhas no tratamento ou nos sistemas de distribuição.

Este procedimento especifica a detecção e enumeração de *Escherichia coli* e Bactérias coliformes. É aplicado a Águas de consumo, Naturais doces: superficial, subterrâneas, termais e balneares, Natural salina: balnear e costeira, Piscina e Processo: uso industrial. Devem ser filtrados sempre 100 mL, com exceção das águas termais que devem ser 250 mL.

Tabela 30 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *E. coli* e bactérias coliformes em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Estufa a 36±2°C	Chromogenic Coliform Agar, CCA
Copos de filtração de 100 ou 250mL		
Papel filtro	Banho-maria [46°C]	Reagente da oxidase
Lâminas	Rampa de filtração	
Ansas	Contador de colónias	PCA
Membranas nitrocelulose 0,45µm		

O meio de cultura utilizado, CCA, possui dois substratos cromogénicos hidrolizáveis, que permitem a detecção simultânea de enzimas específicas. Estas enzimas clivam o substrato cromogénico, libertando o cromogénio. As colónias β-galactosidase positivas apresentam uma coloração de rosa a vermelho, representando os coliformes e as colónias β-glucuronidase positivas apresentam uma coloração de azul-escuro a violeta, representando a *Escherichia coli*. O crescimento de outras bactérias, para além de Enterobacteriaceae, é evitado pela adição de dois antibióticos, um inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e outro inibindo o crescimento de bactérias oxidase-positivas como *Pseudomonas* spp. ou *Aeromonas* spp.. No

entanto, para evitar falsos positivos, as colónias com coloração rosa a vermelho devem ser confirmadas como oxidase-negativas.

Para a realização da análise, em primeiro lugar a amostra é agitada e é filtrado o volume de amostra adequado (ex: 100 mL, 250 mL; dependendo do tipo de água). O filtro é então colocado na placa de Petri sobre o meio de CCA e as placas são por fim incubadas de forma invertida a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $21\pm 3\text{h}$.

1.3-Enterococos intestinais (ISO 7899-2:2000):

Os Enterococos intestinais são microrganismos que fazem parte da flora normal do tracto 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. Podem ainda, ser utilizados como indicadores adicionais da eficácia dos tratamentos a que as águas são sujeitas, pois são mais resistentes do que a *Escherichia coli* e outros coliformes. Devido à sua resistência, são considerados um indicador mais credível de doenças transmitidas pelo contacto com a água e de ocorrência de contaminações recentes.

Este procedimento é aplicado a Águas de consumo, Naturais doces: superficial, subterrâneas, termais e balneares, Naturais salinas: balnear e costeira, Piscina e Processo: uso industrial. É de igual modo aplicável a água engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos. Devem ser filtrados sempre 100 mL, com exceção das águas termais que devem ser 250 mL.

Tabela 31 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Enterococos intestinais em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Estufa a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ Estufa a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Slanetz and Bartley, SB
Copos de filtração de 100 ou 250mL	Rampa de filtração Contador de colónias	Bile-Esculina-Azide Agar, BEA

Para a realização desta análise, em primeiro lugar a amostra é agitada e é filtrado o volume de amostra adequado. De seguida o filtro é colocado na placa de Petri sobre o meio SB e as placas invertidas são, por fim, incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $44\pm 4\text{h}$.

1.4-*Pseudomonas aeruginosa* (ISO 16266:2006):

O género *Pseudomonas* spp. está incluído no grupo de bactérias aeróbias, Gram-negativas, em forma de bastonetes. É um microrganismo móvel. A sua mobilidade é assegurada por um ou vários flagelos polares. A *Pseudomonas aeruginosa*, que pertence a este género, é um patogénico oportunista do Homem, capaz de crescer em águas com baixas concentrações de nutrientes e responsável por um grande número de infecções com gravidade e localização diversificadas. A presença deste microrganismo em águas representa um perigo para a saúde pública. Sendo um organismo nadador livre são-lhe atribuídas infecções no sistema auditivo dos nadadores. Provoca casos sérios e por vezes fatais de pneumonia. É um microrganismo capaz de contaminar alguns alimentos, possuindo também a capacidade de biodegradação de produtos orgânicos complexos. Pode desenvolver-se em feridas ou queimaduras, provocando supurações locais, assim como infecções nos olhos e nos ouvidos, nos tractos urinário e digestivo, podendo ser provenientes da água ou do solo. Este microrganismo pode ser pesquisado nas águas subterrâneas ou de consumo, nas águas de piscinas ou minerais, contando-se entre os microrganismos patogénicos cuja identificação se afigura mais interessante.

Este procedimento é aplicado a Águas de consumo, Naturais doces: superficiais, subterrâneas, termais, Piscina e Processo: uso industrial. É de igual modo aplicável a água engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos. Devem ser filtrados sempre 100 mL, com exceção das águas termais que devem ser 250 mL.

Tabela 32 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Pseudomonas aeruginosa* em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Estufa a 36±2°C Banho-maria [46°C] Rampa de filtração	CN Agar, CN Plate Count Agar, PCA Reagente da oxidase Meio King's B
Copos de filtração de 100 ou 250mL	Lâmpada de UV Contador de colónias	Acetamida Reagente de Nessler

Para a realização desta análise, em primeiro lugar a amostra é agitada e é filtrado o volume de amostra adequado. De seguida o filtro é colocado na placa de

Petri sobre o meio CN e as placas invertidas são, por fim, incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $44\pm 4\text{h}$.

1.5-Estafilococos sp. (Método Interno – NP 4343:1998):

Os Estafilococos são bactérias saprófitas da pele, podem habitar ainda no sistema digestivo (nomeadamente no estômago e intestino grosso), no tracto urinário, no nariz e na conjuntiva dos olhos. São bactérias cocos Gram positivas, aeróbias e anaeróbias facultativas, produtoras da enzima catalase e algumas, como o *Staphylococcus aureus*, produtoras de coagulase. São considerados indicadores de contaminação interhumana, havendo estirpes potencialmente patogénicas. Algumas das substâncias necessárias à desinfecção da água das piscinas, como o cloro, têm uma acção 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.

Este procedimento é aplicado a Águas de consumo, Piscina e Processo: uso industrial. É de igual modo aplicável a água engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos. Devem ser filtrados sempre 100 mL.

Tabela 33 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Estafilococos sp. em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Estufa a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ Banho-maria [46°C]	Manitol Salt Agar, MSA Reagentes de coloração de Gram
Copos de filtração de 100 mL	Rampa de filtração Microscópio Contador de colónias	Reagente de catalase Plate Count Agar, PCA Meio de cultura MEVAG Reagente de coagulase

Para a realização desta análise, em primeiro lugar a amostra é agitada e é filtrado o volume de amostra adequado. De seguida o filtro é colocado na placa de Petri sobre o meio MSA e as placas invertidas são, por fim, incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $44\pm 4\text{h}$.

1.6-Clostridium perfringens (EPA 600:1996):

O *Clostridium perfringens* é um microrganismo anaeróbio obrigatório e produtor de esporos. Esta forma de resistência permite ao *Clostridium perfringens* sobreviver a condições desfavoráveis ao seu crescimento por longos períodos de tempo. Este microrganismo está presente em grande número nas fezes humanas e de outros animais, pois é um membro da flora normal do sistema intestinal. Os seus esporos permitem que resista aos tratamentos efetuados às águas, a temperaturas extremas e a condições ambientais adversas, tornando-o num microrganismo potencialmente perigoso. A avaliação da presença e do número de *Clostridium perfringens* é utilizado como um indicador de contaminação fecal anterior, isto porque, apesar de não se multiplicar na maioria dos ambientes aquáticos, os seus esporos sobrevivem durante um grande espaço de tempo, tornando assim importante a sua pesquisa em águas.

Este procedimento é aplicado a Águas de consumo e Processo: uso industrial. É de igual modo aplicável a água engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos. Devem ser filtrados sempre 100 mL.

Tabela 34 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Clostridium perfringens* em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Estufa a 44,5±0,2°C Rampa de filtração Contador de colónias	m-CP Agar, m-CP
Copos de filtração de 100 mL		Solução de Hidróxido de amónio a 25%
Arcas de anaerobiose		Anaerocult A Anaerotest

Para a realização desta análise, em primeiro lugar a amostra é agitada e é filtrado o volume de amostra adequado. De seguida o filtro é colocado na placa de Petri sobre o meio m-CP e as placas invertidas são colocadas numa arca de anaerobiose. Nessa arca é colocada uma tira de Anaerotest humedecida e uma placa de Anaerocult humedecida com 35 mL de água por cima das placas de petri, sendo a arca é fechada imediatamente. Por fim, a arca é incubada a 44,5±0,2°C durante 24h.

1.7-Esporos de Anaeróbios sulfito-redutores (ISO 6461-2:1986):

Os esporos de anaeróbios sulfito redutores estão largamente espalhados no meio ambiente. Estão presentes na matéria fecal do Homem e de outros animais de sangue quente. Ao contrário da *Escherichia coli* e de outros coliformes, os esporos destes microrganismos sobrevivem na água por longos períodos de tempo, pois são mais resistentes do que as formas vegetativas à acção de factores químicos e físicos. Podem, devido à sua resistência, funcionar como indicadores de contaminação remota ou intermitente. São ainda resistentes à acção do cloro, mesmo nas concentrações utilizadas para o tratamento de águas. Os esporos destes organismos são mais pequenos do que os cistos dos protozoários, e por isso indicadores úteis da eficácia do processo de filtração no tratamento das águas.

Este procedimento é aplicado a Águas de consumo, Naturais doces: superficiais, subterrâneas, termais e balneares e Processo: uso industrial. É de igual modo aplicável a água engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos. É mais utilizado em águas termais pelo que devem ser filtrados 50 mL após sofrerem o choque térmico.

Tabela 35 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Esporos de anaeróbios sulfito-redutores em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de petri	Estufa a $37\pm 1,0^{\circ}\text{C}$	Tryptose Sulfite Cycloserine Agar, TSC Agar
Membranas nitrocelulose 0,22 μm	Banho-maria [46°C]	
Copos de filtração de 100 ou 250mL	Banho-maria [75°C]	Anaerocult A
Arcas de anaerobiose	Rampa de filtração	Anaerotest
	Contador de colónias	

Para a realização desta análise, em primeiro lugar a amostra é colocada no banho de 75°C durante 15 min (*1). A amostra é então agitada e é filtrado o volume de amostra adequado. De seguida o filtro é colocado na placa de Petri sobre o meio m-TSC e as placas invertidas são colocadas numa arca de anaerobiose. Nessa arca é colocada uma tira de Anaerotest humedecida e uma placa de Anaerocult humedecida com 35 mL de água por cima das placas de petri, sendo a arca é fechada imediatamente. Por fim, a arca é incubada a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $44\pm 4\text{h}$.

(*1)- antes de se proceder a este passo, é preciso colocar um frasco igual ao utilizado com o volume adequado de água estéril dentro do banho, com um termopar dentro, para se registrar a contagem do tempo referido quando a água dentro deste frasco atingir a temperatura indicada

1.8-*Legionella sp.* (ISO 11731-2:2004):

A *Legionella sp.*, é um grupo de microrganismos Gram-negativos, bacilos, aeróbios, móveis. É comum em vários ambientes, existindo pelo menos 50 espécies e 70 serogrupos identificados. É um microrganismo habitante de águas naturais, torres de arrefecimento e condensadores de evaporação de sistemas de ar condicionado. Cresce na água e é disseminado através de aerossóis. As infecções provocadas por este microrganismo podem ser desprovidas de sintomas ou ocasionalmente provocar sintomas leves como dores de cabeça e febre. Este microrganismo tem sido encontrado em fontes luminosas, chuveiros, *jacuzzis*, humidificadores, e outros equipamentos de água, incluindo água potável de residências, isto apesar da sua dependência nutricional (para se desenvolver tem de se associar a outras bactérias ou protozoários, dos quais recebe os constituintes que não consegue sintetizar). Devido à sua enorme capacidade de crescer em diferentes ambientes o seu controlo assume extrema importância nos dias de hoje.

Este procedimento é aplicado a Águas de consumo, Naturais doces: superficiais, subterrâneas, termais e balneares, Piscina e Processo: caldeiras, torres de refrigeração e uso industrial.

Tabela 36 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Legionella sp.* em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Copos de filtração de 100 ou 250mL	Estufa a 36±2°C	BCYE Agar, BCYE
Membranas negras de nitrocelulose 0,45µm	Rampa de filtração	
Ansas estéreis		Columbia 5% Agar
		Solução tampão ácida pH 2,2±0,2
Pipetas	Contador de colónias	Solução Salina de Page
		Reagente de aglutinação

Para a realização desta análise, em primeiro lugar a amostra é agitada e é filtrado o volume adequado (*2). Após a filtração da amostra, esta é tratada com a solução tampão ácida pH $2,2 \pm 0,2$, de forma a evitar o crescimento de outras bactérias. De seguida são vertidos 30 ± 5 mL da solução tampão ácida pH $2,2 \pm 0,2$ no copo de filtração e é deixado a atuar durante 5 minutos. Passados os 5 minutos a solução é removida por filtração e a membrana é lavada com 20 ± 5 mL de solução Salina de Page. Por fim, a membrana é colocada sobre o meio de cultura BCYE e as placas invertidas são incubadas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 10 dias.

(*2) - Para análise de *Legionella* é necessário filtrar sempre 1000 mL de amostra quando vem em frasco ou 10 mL quando vem em zaragatoa, podendo ser líquida ou em gel. No caso das zaragatoas líquidas, como o seu conteúdo é de 10 mL, basta verter o líquido da zaragatoa e filtrar consoante o processo descrito acima. Nas zaragatoas de gel (ver Fig.1), é necessário preparar primeiro um tubo com 10 mL de Água Peptonada Tamponada para mergulhar a zaragatoa e agitar no vórtex. Depois é realizado o processo de filtração já referido.



Fig. 1 – Zaragatoa em gel

1.9-Salmonella sp. (ISO 19250:2010):

O género *Salmonella* pertence à família das *Enterobacteriaceae*. A *Salmonella* é um microrganismo Gram-negativo, não produtor de esporos, bacilos, com capacidade para crescer em condições aeróbias ou anaeróbias facultativas. São capazes de produzir sulfureto de hidrogénio (H_2S), a L-lisina descarboxilase e a enzima urease. As espécies de *Salmonella* estão largamente distribuídas por todo o mundo. São normalmente classificadas como patogénicas, apesar da sua virulência e patogenecidade variar. Entre os hospedeiros naturais das espécies de *Salmonella* encontram-se os humanos, animais domésticos e agrícolas, assim como selvagens, incluindo pássaros. Humanos e animais podem excretar esta bactéria quando a transportam assintomaticamente ou durante a fase de doença. Por todos estes motivos torna-se praticamente impossível eliminá-la do ambiente. Esta bactéria

provoca infecções nos humanos, infecções estas que podem ser de vários tipos: formas septicêmicas (febre tifóide), formas digestivas (infecções alimentares que provocam diarreias e vômitos) e outras formas como meningites e hepatites. Para evitar estas infecções graves e a propagação desta bactéria é necessário minimizar os veículos de transmissão. 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. Como as células das espécies de *Salmonella* em água se encontram em baixas concentrações e “stressadas”, é necessário realizar passos de concentração e pré-enriquecimento quando se realiza a pesquisa deste microrganismo.

Este procedimento é aplicado a Águas de consumo, Águas de consumo, Naturais doces: superficiais, subterrâneas, termais e balneares, Naturais salinas: banhar e costeira e Residual: efluentes tratados e não tratados.

Tabela 37 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Salmonella sp.* em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Copos de filtração de 100 ou 250mL	Estufa a 36±2°C	Água peptonada tamponada, APT
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Rampa de filtração	Rappaport-Vassiliadis broth, RVS
		Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth, MKTTn
Ansas estéreis	Banho-maria [41,5±1,0°C]	Xylose Lysine Deoxycholate Agar, XLD Agar
		Verde Brilhante Agar, VB Agar
Pipetas	Banho-maria [46°C]	Plate Count Agar, PCA
	Contador de colónias	TSI Agar
		Galeria de identificação

Para a realização desta análise, em primeiro lugar a amostra é agitada sendo que: em amostras com volume inferior a 10 mL, é inoculada esta ou as suas diluições em 50 mL de água peptonada tamponada e em amostras com volume superior a 10 mL, é filtrado o volume de amostra adequado e colocada a membrana em 50 mL de água peptonada tamponada. De seguida, o frasco é incubado a 36±2°C durante 18±2 horas. Após incubação, é efetuado o enriquecimento selectivo da seguinte forma:

- a. é inoculado 0,1 mL num tubo com 10 mL de RVS

- i. o tubo de RVS é incubado a $41,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas, ou 48 ± 4 horas conforme necessário
- b. é inoculado 1 mL num tubo com 10 mL de MKTTn (neste meio é adicionado 20 μL por tubo de Iodo/Iodeto)
 - i. o tubo de MKTTn é incubado a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas

Após a incubação dos tubos, é utilizada a cultura obtida em RVS e MKTTn e isolada em XLD e Verde Brilhante com a técnica do riscado. As placas de ambos os meios são incubadas invertidas a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.

1.10-Fungos (SMEWW 9610 D:2005):

As águas contêm uma variedade de microrganismos que derivam de diversas fontes, como o solo e as plantas. A má qualidade de uma água utilizada para consumo humano pode constituir um problema de saúde pública. Os fungos estão presentes em habitats com características bastante diferentes e extremas tais como lagos, lagoas, córregos, drenagens de minas, rios, estuários, águas residuais, lamas, sedimentos aquáticos, óleos e refinarias. Podem ser encontrados no sistema de distribuição de água potável e em águas de recreio (piscinas). Os esporos de fungos, as micotoxinas são extremamente resistentes, o que permite a sua sobrevivência por períodos de tempo muito grandes. Algumas das espécies mais patogénicas para o Homem estão presentes em piscinas e água balneares. Possuem relativa facilidade em se desenvolver em diferentes ambientes. Apesar da maioria dos bolores e leveduras serem aeróbios obrigatórios, a sua necessidade ácido/alcalina é bastante abrangente, podem crescer entre pH 2 até pH acima de 9. A sua temperatura de crescimento varia entre $10-35^{\circ}\text{C}$, com algumas espécies capazes de crescer abaixo ou acima desta escala. As necessidades nutricionais dos bolores são bastante baixas, cresce com actividade da água de 0,85 ou menos, no entanto, as leveduras precisam de actividade da água superior. Esta flora microbiana é considerada um indicador do índice de higiene.

Este procedimento é aplicado a água de consumo humano, piscina e recreativa, termal, natural, engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos.

Tabela 38 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Fungos em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Estufa a 20°C	Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar, DRBC
Copos de filtração de 100 ou 250mL	Rampa de filtração	
	Contador de colónias	

Para a realização desta análise, primeiramente a amostra é agitada e é filtrado o volume de amostra adequado. De seguida, o filtro é então colocado na placa de Petri sobre o meio DRBC e as placas invertidas são incubadas a 20°C durante 3 dias. No entanto, dependendo do fungo, pode-se continuar a incubação até 7 dias.

1.11-*Mycobacterium* sp. (SMEWW 9260 M (c):2005):

As águas contêm uma variedade de microrganismos que derivam de diversas fontes, como o solo e as plantas. A má qualidade de uma água utilizada para consumo humano pode constituir um problema de saúde pública. O género *Mycobacterium* sp. é representado por cerca de 70 espécies, imóveis, não formadoras de esporos, aeróbias e com morfologia em forma de bacilo, têm como habitat natural o solo e a água. São de crescimento extremamente lento (3 a 8 semanas) e possuem uma parede celular lipídica complexa capaz de oferecer resistência à maioria dos desinfetantes comuns. Têm sido isolados de sistemas de distribuição de água potável. Algumas espécies são patogénicas para o Homem. A sua patogenicidade causa doenças pulmonares crónicas. A sua principal forma de transmissão é através da ingestão deste microrganismo, no entanto, os casos originados no tracto respiratório indicam que também poderá ser transmitido através de aerossóis.

Este procedimento é aplicado a água de consumo humano, piscina e recreativa, termal, natural, engarrafada, processo, diálise e efluentes líquidos. Normalmente são filtrados 1000 mL de amostra.

Tabela 39 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Mycobacterium sp.* em água

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Copos de filtração de 100 ou 250mL	Estufa a 30°C	Solução 0,04% de cetylpridinium chloride (CPC)
Membranas nitrocelulose 0,45µm	Estufa a 37°C	Solução de Fucsina (Kinyoun Solution)
Ansas estéreis	Rampa de filtração	Azul de metileno (Gabett Solution)
Lâminas	Microscópio	Lowenstein- Jensen
Lamelas		
Pipetas Pasteur	Agitador	Água esterilizada

Para a realização desta amostra, em primeiro lugar, a amostra é agitada e é filtrado o volume adequado. Depois, o filtro é colocado num frasco de 100 ou 200 mL e são adicionados 5 mL de água estéril, sendo posto no agitador durante 1 hora. Por fim é inoculado com o auxílio de uma ansa em meio de cultura Lowenstein-Jensen (tubo) e é incubar a 37°C durante 8 semanas. Os tubos são examinados semanalmente.

Todas as amostras de água analisadas são guardadas na câmara frigorífica a uma temperatura de 5±3°C durante o tempo necessário até ser feita a sua limpeza (ver Anexo 21).

2 - ALIMENTOS E ZARAGATOAS

Conceitos Gerais de Execução de Amostras Alimentares e Zaragatoas (ISO 6887-1:1999, ISO 7218:2007, ISO 18593:2004):

Para a preparação de amostras de alimentos ou zaragatoas devem ser seguidos os seguintes pontos:

- As amostras devem ser manuseadas em condições de assepsia
- Para produtos congelados ou ultra-congelados, deixar à temperatura ambiente [18°C;27°C] no máximo durante 3 horas, ou a 2±2°C durante 24 horas

- Para amostras heterogêneas, retirar várias alíquotas de cada componente na proporção inicial do produto
- Para amostras líquidas, agitar durante alguns segundos de modo a que os microrganismos fiquem distribuídos uniformemente
- As amostras devem ser trabalhadas, pelo menos, com 2 diluições sucessivas, ou com 1 diluição em duplicado.

1-Preparação da Suspensão inicial:

Para Amostras Alimentares Sólidas:

- É necessário pesar a massa da amostra (10g, 25, ou outra massa especificada) para o saco de homogeneização
 - Se for pretendida a pesquisa de *Salmonella sp.* então é necessário pesar 25g de amostra para 225 mL de diluente; No entanto se não for pretendida a pesquisa de *Salmonella sp.* então só será necessário pesar 10g de amostra para 90 mL de diluente (ver Fig. 2)



Fig. 2 – Amostras de alimentos

- Depois de deixar o diluente (Água Peptonada Tamponada) atingir a temperatura ambiente, adicionar a quantidade equivalente a 9xm (g).

Para Amostras Alimentares Líquidas:

- É necessário medir o volume de amostra (10mL, 25mL ou outro volume especificado) para o saco de homogeneização
 - Se for pretendida a pesquisa de *Salmonella sp.* então é necessário pesar 25mL de amostra para 225 mL de diluente; No entanto se não for pretendida a pesquisa de *Salmonella sp.* então só será necessário pesar 10mL de amostra para 90 mL de diluente
- Depois de deixar o diluente (Água Peptonada Tamponada) atingir a temperatura ambiente, adicionar a quantidade equivalente a 9xm (L)
- Caso a amostra possa ser trabalhada diretamente, não são executados os passos anteriores e as diluições são efetuadas a partir da amostra inicial.

Para Amostras de Zaragatoas:

- Não necessita de preparação de suspensão inicial, uma vez que essa será a que está no tubo da zaragatoa. As zaragatoas podem ser líquidas ou em gel (ver Fig. 3).



Fig. 3 – Zaragatoa líquida

2-Homogeneização das Amostras:

Homogeneizador peristáltico para Amostras Alimentares:

- O saco de homogeneização é colocado no equipamento durante 2 minutos na frequência média. Este equipamento é utilizado no laboratório (Bag Mixer – *Stomacher*) – ver Fig. 4.



Fig. 4 – Bag Mixer – *Stomacher*

Homogeneização de Zaragatoas:

- Homogeneizar o conteúdo (líquido de colheita) agitando no vórtex 30 segundos
- A zaragatoa em líquido de colheita representa a suspensão inicial.

3-Preparação de Diluições Decimais e Tempo de Execução:

- Transferir 1 mL da suspensão inicial para um tubo de ensaio com 9 mL de diluente ou em proporção equivalente (9 x volume inóculo)
- Agitar no vórtex 5 segundos e repetir esta operação para as diluições necessárias ao ensaio
- Evitar introduzir a pipeta mais do que 1 cm dentro da suspensão a pipetar, bem como o contacto da pipeta com o inóculo e o diluente estéril
- Evitar exceder 30 minutos entre o tempo de preparação da suspensão inicial e execução das diluições decimais
- Evitar exceder 45 minutos entre a preparação das diluições, e respectivo inóculo com o meio de cultura.

4-Sementeira e Incubação:

De acordo com a norma de cada ensaio, deve ser utilizada uma das seguintes técnicas:

- **Incorporação:** pipetar o volume de inóculo (normalmente 1mL) para a placa de Petri e incorporar o meio de cultura (12 a 15mL) com movimentos rotativos. Deixar solidificar.
- **Espalhamento:** pipetar o volume de inóculo (normalmente 0,1mL) para a placa de Petri e incorporar com um espalhador em movimentos giratórios.

As placas são depois colocadas na estufa, preferencialmente agrupadas em quantidades de 6 (em altura), com espaço de 2,5cm entre cada molho de placas.

De seguida vão ser enumerados os diversos microrganismos que se querem analisar, juntamente com o seu modo de execução, relativamente a alimentos e zaragatoas. As análises e ensaios efetuados são os mesmos tanto para alimentos e zaragatoas. No entanto, os parâmetros a ser analisados dependem de cada cliente e do que pretendem analisar.

Para todos os ensaios é necessário marcar as placas de Petri com o nº interno, data, identificação do meio de cultura e temperatura de incubação.

2.1-Microrganismos a 30°C (ISO 4833:2013-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

Durante o processo de fabrico, manipulação e transporte, os alimentos estão em contacto com diferentes tipos de superfícies (equipamento, utensílios, mãos, embalagens, etc.) com diferentes graus de contaminação de microrganismos. O elevado número de microrganismos que se pode transmitir aos alimentos e a sua natureza, podem ter graves consequências, quer em termos de saúde pública, quer em termos de deterioração do produto. A avaliação do número de microrganismos a 30°C é utilizada como um indicador do aumento do nível de contaminação microbiana nos alimentos. Neste procedimento são pesquisados todos os microrganismos, sejam eles bactérias ou fungos (bolores e/ou leveduras).

Este procedimento é aplicado a alimentos destinados ao consumo humano e animal.

Tabela 40 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Microrganismos a 30°C em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 30±1°C	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
Sacos estéreis de homogeneização	Vórtex	
	Homogeneizador	Plate count agar, PCA
Pipetas	Banho-maria [44°C;47°C]	
	Contador de colónias	

A amostra é inoculada directamente (produtos líquidos) ou homogeneizada numa solução (produtos sólidos ou muito densos). Em ambos os casos são preparadas diluições decimais de acordo com o grau de contaminação esperada, de modo a obter contagens entre 15 e 300 colónias.

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri e são adicionados 12 a 15 mL de PCA, incorporando o meio com o inóculo através de movimentos rotativos; o tempo entre a inoculação e a adição do meio não deve exceder os 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a 30±1°C durante 72±3h.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.2-Bactérias Coliformes a 30°C (ISO 4832:2006-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

As bactérias coliformes são um grupo de bactérias que pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, Gram-negativas, anaeróbias ou aeróbias facultativas, oxidase-negativas, bacilos, não produtoras de esporos, fermentam a lactose para além da glucose, produzindo ácido e gás, quando incubadas a 36°C durante 48h, pois possuem a enzima β -D-galactosidase, que quebra as ligações β -1,4 da lactose.

Algumas bactérias coliformes como a *Escherichia coli* fazem parte da flora normal do intestino do Homem e dos animais de sangue quente e por este motivo estas bactérias são consideradas indicadores de contaminação fecal. No entanto, apesar de serem fáceis de detectar, a sua associação com a contaminação fecal não é tão linear, isto porque estas bactérias têm sido encontradas em outros ambientes. Por este motivo, este parâmetro serve como indicador das condições sanitárias do local de processamento do alimento, serve ainda como indicador da qualidade quando pesquisado nos alimentos. 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.

Tabela 41 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Bactérias coliformes a 30°C em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 30±1°C	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
Sacos estéreis de homogeneização	Vórtex	
	Homogeneizador	Violet Red Bile Lactose Agar, VRBL
Pipetas	Banho-maria [46°C]	
	Contador de colónias	

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri e são adicionados 12 a 15 mL de VRBL, incorporando o meio com o inóculo através de movimentos rotativos; Após solidificar, são adicionados aproximadamente mais 4 mL de meio e novamente é deixado a solidificar. O tempo entre a inoculação e a adição do meio não deve exceder os 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a 30±1°C durante 24±2h.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.3-*Escherichia Coli* (ISO 16649-1:2001-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) -zaragatoas):

Um microrganismo de especial importância na análise realizada a alimentos é a *Escherichia coli*. Este microrganismo pertence à família das *Enterobacteriaceae* e ao grupo dos coliformes termotolerantes, é capaz de fermentar a lactose e crescer a uma temperatura elevada (44°C). É uma bactéria indígena do tracto intestinal do Homem e dos animais de sangue quente. A *E.coli* além de produzir a enzima β -D-galactosidase que degrada a lactose, também possui a β -D-glucuronidase que desdobra o substrato cromogénico, BCIG (ácido 5-bromo-4- cloro-3-indoxil- β -D-glucurónico), presente no meio TBX (meio utilizado neste procedimento) originando colónias azuis/ verdes. Pelo facto de ser uma bactéria indígena do tracto intestinal, funciona como um indicador de contaminação fecal, contaminação esta que pode ser causada devido ao mau manuseamento do alimento ou às más práticas de higiene por parte dos manipuladores. Praticamente todos os alimentos, quer de origem vegetal ou animal que não tenham sido objectos de processamento, podem veicular a *E. coli*, desde que, em algum momento, tenham sido sujeitos a contaminação fecal, tornando este microrganismo um perigo sempre à espreita.

Tabela 42 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Escherichia coli* em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 44±1°C	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
Sacos estéreis de homogeneização	Vórtex	TBX, Tryptone-Bile-Glucuronic Agar
	Homogeneizador	
Pipetas	Banho-maria [46°C]	
	Contador de colónias	

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri e são adicionados 12 a 15 mL de TBX, incorporando o meio com o inóculo através de movimentos rotativos. O tempo entre a inoculação e a

adição do meio não deve exceder os 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24h.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.4-Enterobacteriaceae (ISO 21528-2:2004-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

As *Enterobacteriaceae* são bactérias Gram-negativas, catalase-positivas, oxidase-negativas, com capacidade para reduzir os nitratos a nitritos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, fermentadores da glucose e algumas com mobilidade. Desta família fazem parte inúmeros microrganismos, incluindo muitos indígenas do tracto 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. Podem provocar septicemias, infecções do tracto urinário, meningites, gastroenterites, entre outras patologias. 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.

Tabela 43 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Enterobacteriaceae* em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
Sacos estéreis de homogeneização	Vórtex	
	Homogeneizador	VRBG, Violet Red Bile Glucose Agar
Pipetas	Banho-maria [46°C]	PCA, Plate Count Agar
Ansas estéreis	Contador de colónias	Glucose Agar
		Reagente da oxidase

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados

no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri e são adicionados 12 a 15 mL de VRBG, incorporando o meio com o inóculo através de movimentos rotativos. Após solidificar adicionar aproximadamente mais 15 mL de meio e novamente deixar solidificar. O tempo entre a inoculação e a adição do meio não deve exceder os 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.5-Estafilococos coagulase-positiva (ISO 6888-1:1999-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

Um dos microrganismos que se pode transmitir aos alimentos é o *Staphylococcus aureus*. Este microrganismo pertence à família dos *Micrococcaceae*, são cocos associados aos pares, Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase-positivos e oxidase-negativos. Algumas espécies de *Staphylococcus* produzem a enzima coagulase, é o caso do *Staphylococcus aureus*. Estes microrganismos produzem ainda uma enterotoxina termo-estável que provoca no Homem intoxicações. Apesar disso, é bastante vulnerável a temperaturas elevadas e a praticamente todos os agentes de desinfecção. O Homem é o principal reservatório de *S.aureus*, pode ser encontrado na mucosa nasal e oral, pele, cabelo, furúnculos, feridas e abscessos. Por este motivo a contaminação dos alimentos ocorre essencialmente devido à inadequada manipulação destes e más práticas de higiene. A intoxicação por *S.aureus* está associada a produtos como carne, aves, produtos do ovo, batata, produtos de confeitaria, recheios de sandes e produtos lácteos. Assim quando presente nos alimentos e principalmente em alimentos processados é um indicador de más condições sanitárias.

Tabela 44 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Estafilococos coagulase-positiva em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
Sacos estéreis de homogeneização	Vórtex	
	Homogeneizador	Baird-Parker Agar, BP
Pipetas	Banho-maria [46°C]	

Ansas estéreis	Contador de colônias	Reagente da coagulase
Espalhadores de plástico estéreis		

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 0,1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri sendo o inóculo espalhado em meio BP com o auxílio do espalhador; O inóculo é deixado a secar durante 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $48\pm 2\text{h}$.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.6-Bactérias sulfito-redutoras (ISO 15213:2003-alimentos):

As bactérias sulfito-redutoras são microrganismos anaeróbios. Produzem esporos que são 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. Estão presentes na material fecal dos humanos e dos animais, em águas residuais e nos solos. Ao contrário da *E.coli* e outros organismos coliformes, os esporos sobrevivem por longos períodos à medida que se tornam mais resistentes à acção dos factores químicos e físicos do que as formas vegetativas. Esta capacidade de produzir esporos e da resistência destes, torna estas bactérias perigosas e a sua pesquisa em águas e alimentos muito importante.

Tabela 45 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Bactérias sulfito-redutoras em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
Sacos estéreis de homogeneização	Vórtex	
	Homogeneizador	Tryptose Sulfite

		Cycloserine Agar, TSC Agar
Pipetas	Banho-maria [46°C] e [75°C]	Anaerotest
Arca de anaerobiose	Contador de colónias	Anaerocult A

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri e são adicionados 12 a 15 mL de TSC, incorporando o meio com o inóculo através de movimentos rotativos. Após solidificar são adicionados aproximadamente mais 15 mL de meio e é novamente deixado a solidificar. Após solidificar é adicionada aproximadamente uma segunda camada de 5 a 10 mL de meio e novamente deixado a solidificar. O tempo entre a inoculação e a adição do meio não deve exceder os 15 minutos. As placas invertidas são colocadas numa arca de anaerobiose. Nessa arca é colocada uma tira de Anaerotest humedecida e uma placa de Anaerocult humedecida com 35 mL de água por cima das placas de petri, sendo a arca fechada imediatamente. Por fim a arca é incubada a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48h.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.7-Clostridium perfringens (ISO 7937-alimentos:2004):

O *Clostridium perfringens* é um microrganismo, Gram-positivo, bacilo, anaeróbio obrigatório, fermenta a lactose e produz esporos, estes são muito resistentes ao calor, desinfetantes e outras condições desfavoráveis ao seu crescimento, ao contrário da forma vegetativa deste microrganismo. Tem a capacidade de produzir toxinas que provocam problemas intestinais. A produção de enterotoxinas aliada à capacidade de produzir esporos dá origem à elevada patogenicidade deste microrganismo. A sua temperatura ótima de crescimento é entre os 37 e os 45°C. Apesar de ser um microrganismo muito resistente é inibido por concentrações de NaCl superior a 5%. O *Clostridium perfringens* é um microrganismo muito frequente e

ubiquitário, pode ser encontrado no solo, água e no tracto intestinal de vários animais incluindo o do Homem. Pode ainda ser encontrado em alimentos como: carne crua, sopa desidratada, vegetais e especiarias. Pode também ser encontrado em alimentos mal cozinhados, pois os seus esporos sobrevivem à cozedura, germinam e crescem rapidamente nos alimentos, principalmente se estes não forem armazenados após a cozedura a temperaturas adequadas e por este motivo é frequente o desenvolvimento desta bactéria em alimentos preparados várias horas antes de serem consumidos, como no caso das cantinas de escolas, prisões e hospitais. No entanto, as células de *Clostridium perfringens* perdem a sua viabilidade quando o alimento é congelado ou fica durante um longo período de tempo a temperaturas de refrigeração. Esta perda de viabilidade pode impossibilitar a ligação desta espécie com a contaminação presente em determinado alimento.

Tabela 46 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Clostridium perfringens* em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 37±1°C	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
Sacos estéreis de homogeneização	Vórtex	
	Homogeneizador	Tryptose Sulfite Cycloserine Agar, TSC Agar (c/ D-cycloserine)
Pipetas	Banho-maria [46°C]	Anaerocult A
Pipetas de Pasteur	Contador de colónias	
Arca de anaerobiose		

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri e são adicionados 12 a 15 mL de TSC (c/ D-cycloserine), incorporando o meio com o inóculo através de movimentos rotativos. O tempo entre a inoculação e a adição do meio não deve exceder os 15 minutos. As placas invertidas são colocadas numa arca de anaerobiose. Nessa arca é colocada uma tira de Anaerotest humedecida e uma placa de Anaerocult humedecida com 35

mL de água por cima das placas de petri, sendo a arca é fechada imediatamente. Por fim a arca é incubada a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $20\pm 2\text{h}$.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.8-Salmonella (ISO 6579:2002-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9)-zaragatoas):

A *Salmonella* é um microrganismo que pertence à família das *Enterobacteriaceae*. Existem apenas 2 espécies de *Salmonella* (entérica e bongori) e mais de 2000 serótipos. É um bacilo, Gram-negativo, oxidase-negativo, catalase-positivo, fermentador da glucose, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos e móvel (através de flagelos periféricos, com duas exceções que são imóveis *S. gallinarum* e *S. pullorum*). O reservatório natural da *Salmonella* é o tracto intestinal dos humanos e dos animais. É transmitido aos humanos quando estes consomem alimentos ou água contaminada, contaminação esta, que pode ocorrer devido à má manipulação dos alimentos, más condições de higiene do local de manipulação e más práticas de higiene por parte dos manipuladores, sendo esta a principal fonte de contaminação cruzada. Os principais alimentos susceptíveis à contaminação por *Salmonella* são o leite, queijo, chocolates e carnes principalmente frescas e de aves. Uma das formas de eliminar este microrganismo dos alimentos é submeter este a tratamentos térmicos adequados, como cozedura e reaquecimento. A *Salmonella* é um indicador de más práticas de higiene e confecção dos alimentos.

Tabela 47 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Salmonella* sp. em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
	Vórtex	
Sacos estéreis de homogeneização	Homogeneizador	Rappaport-Vassiliadis broth, RVS
		Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth, MKTTn
		Xylose Lysine Deoxycholate Agar, XLD Agar
Pipetas	Banho-maria [46°C] e [$41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$]	Verde Brilhante Agar, VB Agar Plate Count Agar, PCA

Ansas estéreis	Contador de colónias	TSI Agar
		Galeria de identificação
		Kits de aglutinação (confirmação serológica)

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, é incubado a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\pm 2\text{h}$. Após a incubação, faz-se a inoculação de 0,1 mL num tubo com 10 mL de RVS e 1 mL num tubo com 10 mL de MKTTn, sendo depois incubados os tubos de RVS a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ e os tubos de MKTTn a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, ambos durante $24\pm 3\text{h}$. De seguida, as culturas obtidas em RVS e em MKTTn são isoladas em XLD e Verde Brilhante, inoculando 2 placas de XLD e VB para cada meio de pré-enriquecimento (2 XLD para RVS+2 XLD para MKTTn+2 VB para RVS+2 VB para MKTTn). Por fim as placas são incubadas invertidas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\pm 3\text{h}$.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.9-Bolores e Leveduras (ISO 21527-1:2008-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

O grande e diverso grupo de bolores e leveduras capazes de se desenvolver em alimentos, inclui várias centenas de espécies. A capacidade que estes organismos possuem de atacar diversos alimentos, deve-se sobretudo à sua relativa facilidade em se desenvolver em diferentes ambientes. 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 $10\text{-}35^{\circ}\text{C}$, com algumas espécies capazes de crescer abaixo ou acima desta escala. As necessidades nutricionais dos bolores são bastante baixas, cresce com actividade da água de 0,85 ou menos, no entanto, as leveduras precisam de actividade da água superior. Tanto os bolores como as leveduras causam vários níveis de deterioração e decomposição dos alimentos. Podem invadir e crescer literalmente em qualquer tipo de alimento, incluindo os processados e misturados. A sua detecção 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 e animal, devido à sua capacidade de produzirem toxinas, designadas de micotoxinas. 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. Alguns bolores e leveduras presentes no alimento contaminado podem desencadear reacções alérgicas ou causar infecções. Esta flora microbiana é considerada um indicador do índice de higiene.

Tabela 48 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Bolores e leveduras em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 25±1°C	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
	Vórtex	
	Homogeneizador	
Sacos estéreis de homogeneização	Microscópio	Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar, DRBC
Pipetas	Contador de colónias	

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 0,1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri sendo o inóculo espalhado em meio de DRBC com o auxílio do espalhador; O inóculo é deixado a secar durante 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a 25±1°C durante 5 dias. Ao 2º e 5º dia é feita a contagem e, se necessário, observa-se ao microscópio.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.10-*Bacillus cereus* (ISO 7932-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

O género *Bacillus* pertence à família *Bacillaceae*. Os *Bacillus cereus* são bacilos, Gram-positivos, produtores de esporos em condições aeróbias e móveis. São resistentes a temperaturas elevadas e têm um curto tempo de germinação. Para que ocorra germinação é necessário que o meio possua determinadas moléculas como a glicina ou a alanina. São fortemente hemolíticos, catalase-positiva e têm a capacidade de fermentar a glucose e a maltose. O *Bacillus cereus* é uma bactéria de natureza ubiquitária. Pode ser encontrada no solo, ar, matéria em decomposição, água, poeira e alimentos. Nos alimentos pode ser encontrada na carne, leite, vegetais e pescado.

Provoca intoxicações devido à produção das suas toxinas. Para evitar estas intoxicações é necessário ter cuidados no pós-processamento dos alimentos. Quando devidamente cozinhados os microrganismos são destruídos. Os problemas normalmente surgem durante o tempo de arrefecimento, neste período ocorre o desenvolvimento dos microrganismos. Uma forma de evitar este acontecimento é a manutenção da temperatura superior a 60°C nos alimentos que não são servidos após a confecção, outra forma é o cumprimento das normas básicas de higiene na confecção dos produtos. Pela sua natureza patogénica e capacidade de se desenvolver em diferentes alimentos, a enumeração deste microrganismo é importante nas análise alimentar.

Tabela 49 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Bacillus cereus* em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 30±1°C	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
	Vórtex	
Sacos estéreis de homogeneização	Homogeneizador	MYP Agar, MYP
Pipetas	Contador de colónias	
Ansas estéreis		Columbia 5% Agar,

Espalhadores de plástico estéreis		Columbia 5%
-----------------------------------	--	-------------

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 0,1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri sendo o inóculo espalhado em meio MYP com o auxílio do espalhador; O inóculo é deixado a secar durante 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a 30±1°C durante 18 a 24h. Caso as colónias, ao fim deste tempo, não sejam claramente visíveis, as placas são incubadas mais 24 horas.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.11-*Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2/Amd.1:2004-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, móvel por flagelos, catalase-positiva, com capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração, hidrolisa a bile-escolina, é β-hemolítica e é a única espécie de *Listeria* com potencial patogénico para o Homem. É um patogénico intracelular, multiplica-se dentro dos fagócitos, induzindo a formação de granulomas, relacionando-se assim com a imunidade celular específica de cada indivíduo. As populações mais susceptíveis são as grávidas, idosos, crianças e pessoas imunodeprimidas. Este microrganismo encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente, solo, vegetais, água e alimentos como o leite cru e laticínios, gelados, produtos fumados, frango e pescado cru. Os vegetais são contaminados devido ao uso indevido de fertilizantes orgânicos. Para evitar esta contaminação é necessário respeitar regras de higiene. Devido à sua resistência a baixas temperaturas é importante ter em atenção a higienização dos frigoríficos bem como o acondicionamento dos alimentos no mesmo. Deve evitar-se contaminação

cruzada, mantendo alimentos prontos separados dos crus, lavando e desinfetando bem os utensílios e as superfícies.

Tabela 50 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de *Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* em alimentos e zaragatoas

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a 37±1°C	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	OCLA Agar
	Vórtex	Columbia 5%
		PCA, Plate Count Agar
Sacos estéreis de homogeneização	Homogeneizador	Reagente da catalase
		Coloração de Gram
Pipetas	Contador de colônias	Rhamnose test
Espalhadores de plástico		Xylose test

Para a realização desta análise, no caso de amostras alimentares, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 0,1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri com meio OCLA, sendo o inóculo espalhado em meio OCLA com o auxílio do espalhador; O tempo entre a inoculação e a adição do meio não deve exceder os 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a 30±1°C durante 24±3h. Caso não existam colônias características ao fim de 24 horas, as placas são deixadas a incubar mais 24±3h.

No caso das zaragatoas o procedimento é o mesmo, sendo que aqui a solução-mãe é a zaragatoa e as diluições decimais são preparadas a partir daqui.

2.12-Microrganismos psicotróficos (NP2307:1987-alimentos):

Os microrganismos psicotróficos predominam em carcaças, carnes de aves e animais, podem multiplicar-se, mesmo que lentamente, em temperaturas iguais ou inferiores a 0°C, tendo como temperatura ótima de crescimento 15°C ou menos. São responsáveis por grande parte das alterações dos produtos, o que faz com que o

tempo de vida comercial da carne de aves, dependa tanto da sua conservação como do número de microrganismos presentes nesta após a sua obtenção. Devido ao facto destes microrganismos crescerem a temperaturas baixas é necessário ter em atenção a limpeza e higienização de frigoríficos e câmaras frigoríficas.

Tabela 51 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados para análise de Microrganismos psicotróficos em alimentos

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Estufa a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$	Água peptonada tamponada, APT
Tubos de ensaio	Balança centesimal	
	Vórtex	
Sacos estéreis de homogeneização	Homogeneizador	Plate Count Agar, PCA
Pipetas	Banho-maria [47°C]	
	Contador de colónias	

Para a realização desta análise, é pesada a massa de amostra (10, 25g, ...) ou medido o volume da amostra (10, 25mL, ...) para o saco homogeneizador e é adicionado APT. O saco é colocado no homogeneizador peristáltico – *Stomacher* - (2 min.; frequência média) e depois de pronto, são preparadas as diluições decimais adequadas em tubos APT sendo homogeneizados no vórtex durante 5 segundos. De seguida, é pipetado 1 mL da amostra e respectivas diluições para a placa de Petri e são adicionados 12 a 15 mL de PCA, incorporando o meio com o inóculo através de movimentos rotativos; o tempo entre a inoculação e a adição do meio não deve exceder os 15 minutos. Por fim as placas são incubadas invertidas a $6,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias

3 - AMOSTRAS DE AR (EN 13098:2000 (7 E 8))

Os poluentes que afetam a qualidade do ar têm a forma de gases ou partículas. As partículas acumulam-se como pó em cima das superfícies. O pó dentro dum edifício contém bactérias, diferentes tipos de esporos, fibra de vidro e outros materiais que causam irritações cutâneas ou respiratórias por serem tóxicos e alergénicos.

Os sistemas de ventilação podem trazer poluentes do exterior, podem ser a fonte de poluentes, podem causar a passagem de poluentes de um local do edifício para outro, ou podem falhar em diluir ou remover poluentes do edifício ou parte dele. Somando todos estes factores temos a maior causa individual de problemas com a Qualidade do Ar Interior (QAI): sistemas de ventilação mal projectados, instalados, operados ou mantidos.

Os poluentes mais comuns gerados dentro de um sistema de ventilação são os fungos e bactérias, resultantes de problemas com água (habitualmente água parada nas bandejas de condensados e de infiltração das chuvas), fibra de vidro de isolamentos deteriorados e sujidade comum devido ao sistema ter funcionado muito tempo sem limpezas ou com deficiente filtragem.

Os efeitos ou consequências para a saúde são febre, dores de cabeça, fadiga e dor muscular, efeitos irritantes nos olhos, nariz, garganta e pele.

Especificamente, na pesquisa de fungos, a CDC-Center for Disease Control and Prevention, refere que não é significativa a sua identificação, uma vez que qualquer que seja a espécie, esta deve ser considerada como um potencial risco para a saúde.

Tabela 52 – Materiais, equipamentos e reagentes utilizados nas análises a amostras de ar

MATERIAL	EQUIPAMENTO	REAGENTES
Placas de Petri	Amostrador de Ar (Q=100L/min)	Plate count agar ou TSA com cicloheximida (50 µg/mL)
	Estufa a 25°C	
	Estufa a 22°C	
	Estufa a 30°C	
	Estufa a 37°C	Malt Extract Agar com cloranfenicol (100 µg/ mL), MEA
	Banho-maria [46°C]	
	Contador de colónias	

A amostra é inoculada directamente por compactação, no processo de amostragem. As placas são incubadas em aerobiose a 25°C durante 7 dias. Para a quantificação de bactérias é utilizado um meio nutritivo com antibiótico (PCA ou TSA com adição de ciclohexamida) e para a quantificação de fungos é utilizado um meio específico (MEA com adição de cloranfenicol).

As temperaturas de incubação para as amostras de ar são previamente decididas pelo cliente.

Tabela 53 – Temperaturas e tempos mais comuns para as amostras de ar

Exemplos de temperaturas e tempos de incubação mais comuns			
Bactérias		Fungos	
Temperaturas	Tempos	Temperaturas	Tempos
37°C	48h	25°C	5 dias
25°C	5 dias		
22°C	5 dias		

RESULTADOS, PROVAS DE CONFIRMAÇÃO E CÁLCULOS

Nesta parte do relatório irei dividir também por matrizes (águas, alimentos, zaragatoas e ar) referindo os resultados que são obtidos em cada análise e consequentes provas de confirmação, caso existam, terminando com os cálculos que são efetuados.

1-ÁGUAS

1.1-Microrganismos a 36°C e 22°C (ISO 6222:1999):

As leituras são efetuadas em todas as placas com colónias, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colónias por volume de amostra inoculada.

Quando o número de colónias é >300 o resultado é dado como >300. Para estes microrganismos não são realizadas provas de confirmação.

1.2-*Escherichia coli* e bactérias coliformes (ISO 9308-1:2014):

Neste ensaio são selecionadas todas as placas com colónias características, ou seja, para a contagem de Bactérias coliformes contar todas as colónias com cor rosa a vermelho e azul-escuro a violeta, para a contagem de *Escherichia coli* contar todas as colónias com cor de azul-escuro a violeta e prosseguir para as provas de confirmação (ver Fig. 5 e 6).

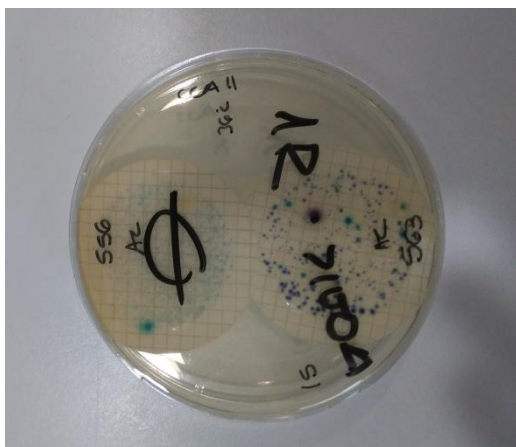


Fig. 5 – *E. coli* e coliformes em meio CCA

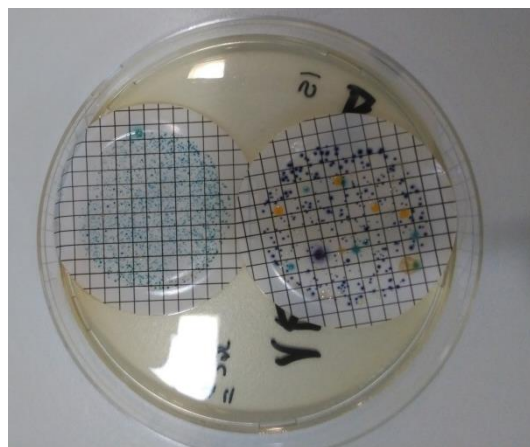


Fig. 6 – *E. coli* e coliformes em meio CCA

Para diferenciar as colónias suspeitas de coliformes, diferentes de *E.coli*, é necessário realizar o teste da oxidase que é feito do seguinte modo: são repicadas todas ou pelo menos 10 colónias suspeitas para PCA, e as placas são incubadas invertidas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $20\pm 3\text{h}$.

Após o tempo de incubação, são pesadas 0,05g de *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (reagente da oxidase) para um frasco coberto com papel de alumínio, sendo dissolvidas depois em 5 mL de água. O reagente é utilizado o mais rápido possível de forma a evitar a sua oxidação.

De seguida é colocado um papel de filtro numa lâmina, sendo humedecido com 2 a 3 gotas de reagente da oxidase. As colónias são repicadas com o auxílio de uma ansa e colocadas em contacto com o papel de filtro já com o reagente, sendo a reacção de oxidase positiva quando ocorre produção de cor azul-púrpura após 10 segundos.

Após a prova de confirmação, são consideradas como coliformes todas as colónias de rosa a vermelho oxidase-negativa e de azul-escuro a violeta. O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume filtrado e quando o número de colónias é >100 o resultado é dado como >100 .

1.3-Enterococos intestinais (ISO 7899-2:2000):

Neste ensaio são seleccionadas todas as placas com colónias características que apresentam cor vermelha, castanha e rosa prosseguindo para as provas de confirmação.

Para as provas de confirmação são pré-aquecidas placas com meio de cultura Bile-Esculina-Azide a 44°C durante 5 minutos. Após este tempo, a membrana é transferida em condições de assepsia para o meio pré-aquecido e as placas são incubadas a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas e a leitura é efetuada de imediato. São então consideradas como Enterococos intestinais as colónias que, após o teste de confirmação, apresentem cor negra. O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume filtrado e quando o número de colónias é >100 o resultado é dado como >100 .

1.4-*Pseudomonas aeruginosa* (ISO 16266:2006):

Neste ensaio são seleccionadas todas as placas com colónias características com consequentes provas de confirmação:

- cor azul-verde (com ou sem fluorescência) – são consideradas como colónias de *Pseudomonas aeruginosa* confirmadas (ver Fig. 7 e 8);
- fluorescentes com cor não azul-verde – são consideradas como colónias de *Pseudomonas aeruginosa* suspeitas;
- castanho-avermelhado – são consideradas como colónias de *Pseudomonas aeruginosa* suspeitas.

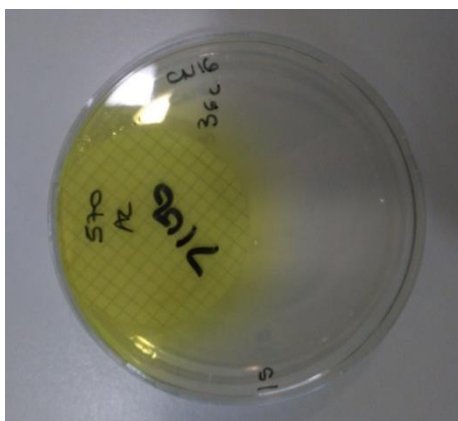


Fig. 7 – *P. aeruginosa* em meio CN

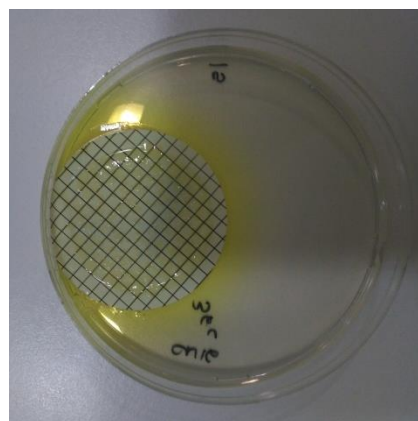


Fig. 8 – *P. aeruginosa* em meio CN

Para as provas de confirmação são repicadas para PCA pelo menos 5 colónias e as placas são incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $22\pm 2\text{h}$. Para as colónias fluorescentes com cor não azul-verde é efectuado o teste da produção de amónia em acetamida e para as colónias de cor castanho-avermelhado é realizado o teste de produção de amónia em acetamida, oxidase e fluorescência em King B.

Teste de produção de amónia em acetamida

As colónias são inoculadas num caldo nutritivo de acetamida e os tubos são incubados a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $22\pm 2\text{h}$. Após a incubação, são adicionadas 1 a 2 gotas de reagente de Nessler e a reacção é positiva quando há produção de cor que varia de amarelo a vermelho tijolo.

Teste de oxidase

O teste de oxidase é realizado da mesma forma que já foi explicada anteriormente, sendo a reacção de oxidase positiva quando há produção de cor azul-púrpura após 10 segundos.

Teste de fluorescência em King B

As colónias oxidase positiva são repicadas para meio de cultura King's e as placas são incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias. As colónias que se desenvolvem são observadas diariamente na lâmpada de UV, sendo a reacção positiva quando ocorre fluorescência durante o tempo de incubação.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume filtrado e quando o número de colónias é >100 o resultado é dado como >100 .

1.5-Estafilococos sp. (Método Interno - NP 4343:1998):

Neste ensaio são seleccionadas todas as placas com colónias características do meio, ou seja, amarelas ou brancas, com ou sem halo (ver Fig. 9 e 10), eliminando as grandes e mucosas, que correspondem ao género *Bacillus*, agrupando as colónias suspeitas pelo seu aspeto.



Fig. 9 – Estafilococos sp.



Fig. 10 – Estafilococos sp.

Para as provas de confirmação são repicadas para PCA 3 colónias e as placas são incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\pm 4\text{h}$. Após o tempo de incubação, é efetuada a

coloração de Gram e para as colónias cocos de Gram positivo são efectuadas as provas de catalase, tipo respiratório e coagulase.

Coloração de Gram

Esta técnica de coloração das células bacterianas 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. Esta divisão dos resultados advém das diferenças de estrutura da parede celular dos dois grupos e correlaciona-se com outras grandes diferenças. Para a realização desta técnica, primeiramente, os reagentes são deixados a atingir a temperatura ambiente. De seguida é realizado um esfregaço com a colónia em estudo e é fixada à lâmina, sendo logo após coberta com o corante Cristal Violeta. Depois de deixar reagir por 1 minuto, a lâmina é enxaguada gentilmente durante alguns segundos com água e coberta com o fixante Lugol, onde é deixado a reagir por 1 minuto também. De seguida a lâmina é enxaguada durante alguns segundos com água e depois é vertido sobre o esfregaço gentilmente e continuamente etanol (95 %), nunca por um período superior a 30 segundos e até não ser visível a cor violeta. A lâmina é enxaguada novamente durante alguns segundos com água, de forma a eliminar o etanol e é coberta por último com o corante Safranina durante 1 minuto. Por fim, a lâmina é enxaguada com água e é deixada a secar antes de ser visualizada no microscópio na objectiva de imersão (óleo de imersão). Só se procedem aos testes seguintes se forem observados cocos Gram+.

Teste de catalase

Após o reagente atingir a temperatura ambiente, é colocada uma gota numa lâmina e é inoculada uma colónia característica. A reacção de catalase é positiva quando ocorre produção de bolhas de oxigénio.

Teste de fermentação

As colónias são inoculadas para o meio de glucose púrpura em tubos com uma picada central e são depois incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\pm 4\text{h}$. A reacção positiva é caracterizada pela produção de cor amarela ao longo do tubo (ver Fig. 11).

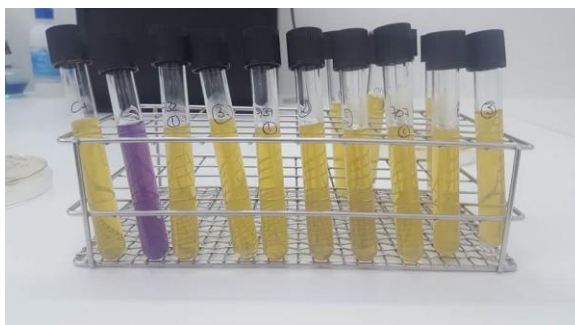


Fig. 11 – Teste de tipo respiratório

Teste da coagulase (por aglutinação)

Após os reagentes atingirem a temperatura ambiente, numa carta descartável, é colocado num dos círculos 1 gota de R1 (reagente da coagulase) e no outro uma gota de R2 (controlo negativo). As colónias suspeitas são inoculadas nos reagentes e misturadas cuidadosamente durante 10 segundos. É dado à carta um ligeiro movimento rotativo durante 20 segundos para ser possível ler a reacção. Um resultado positivo é indicado pelo aparecimento com o reagente R1 de uma aglutinação (aglomerado de pequenas massas) em 30 segundos. Um resultado negativo é indicado pela ausência de aglutinação com os reagentes R1 e R2.

São consideradas como *Estafilococos* sp. (*Estafilococos* não produtores de coagulase) todas as colónias catalase positiva e tipo respiratório positivo. São consideradas como *Staphylococcus aureus* (*Estafilococos* produtores de coagulase) todas as colónias catalase positiva, tipo respiratório positivo e coagulase positiva.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume filtrado e quando o número de colónias é >100 o resultado é dado como >100.

1.6-*Clostridium perfringens* (EPA 600:1996):

Neste ensaio são seleccionadas todas as placas com colónias características com cor amarela opaca (ver Fig. 12 e 13).

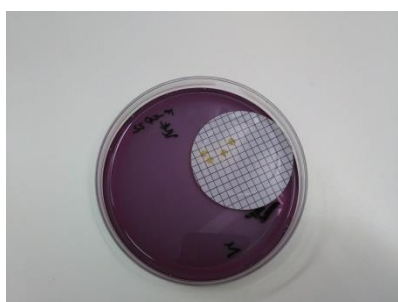


Fig.12 – *Clostridium perfringens* em água



Fig.13 – *Clostridium perfringens* em água

Para as provas de confirmação, é efetuado o Teste do Hidróxido de Amônio, onde, numa hotte, é colocado na tampa da placa de Petri do meio umas gotas de Hidróxido de amônio para depois ser colocada a parte inferior da placa sobre a tampa e esperar aproximadamente 20 a 30 segundos para *que se libertem os vapores de Hidróxido de amônio*. São consideradas colónias de *Clostridium prenfringens*, aquelas que após o teste de confirmação apresentem cor rosa-escuro a magenta (ver Fig. 14 e 15).



Fig. 14 – Prova de confirmação com amônia



Fig.15 – Prova de confirmação com amônia

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume filtrado e quando o número de colónias é >100 o resultado é dado como >100 .

1.7-Esporos de Anaeróbios sulfito-redutores (ISO 6461-2:1986):

Neste ensaio são selecionadas todas as placas com colónias características que apresentam cor negra, não sendo necessárias provas de confirmação.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume filtrado e quando o número de colónias é >100 o resultado é dado como >100 .

1.8-*Legionella sp.* (ISO 11731-2:2004):

Neste ensaio são consideradas como colônias suspeitas de *Legionella sp.* as que apresentam coloração branca, acinzentada, azulada, roxo, castanha, rosa, verde-lima ou vermelha, e que apresentem uma aparência semelhante a vidro estilhaçado no rebordo da colônia, quando observadas à lupa estereoscópica. Também são consideradas como colônias suspeitas de *Legionella sp.* aquelas que apresentam fluorescência quando expostas à luz UV.

Para as provas de confirmação são seleccionadas no mínimo 5 colônias características, sendo repicadas estas colônias para o meio Columbia 5% Agar. As placas são incubadas invertidas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 2 dias. São consideradas como *Legionella sp.* todas as colônias que não apresentam crescimento em Columbia 5% Agar.

Para a identificação de *Legionella* são efetuados a identificação bioquímica e por fim o teste de serologia.

Na galeria de identificação de bactérias (Microgen-A), é colocada uma colônia em 3 mL de solução salina. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur são colocadas 3 a 4 gotas por poço, cobrindo os poços 1, 2, 3 e 9 com óleo de imersão. A galeria é tapada com a película que a acompanha e é incubada a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas (ver Fig. 16 e 17). O teste da oxidase é efetuado em separado e é anotado o resultado.

Após a incubação, são adicionados os reagentes necessários em alguns testes e a leitura é efetuada através do programa:

- no poço 8: são adicionadas 2 gotas de reagente de Kovacs, e o resultado é lido após 60 segundos;
- no poço 10: é adicionada 1 gota de VPI e 1 gota de VP II, e o resultado é lido após 15-30 minutos;
- no poço 12: é adicionada 1 gota de TDA, e o resultado é lido após 60 segundos.

Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs												
Microgen™ GN A ID												
WELL/NAEPFCHEN /CODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reaction	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.
Negative	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue	White	Yellow	Yellow	White	White	Yellow
Positive	Blue	Blue	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Blue	Black

Fig. 16 – Microgen-A

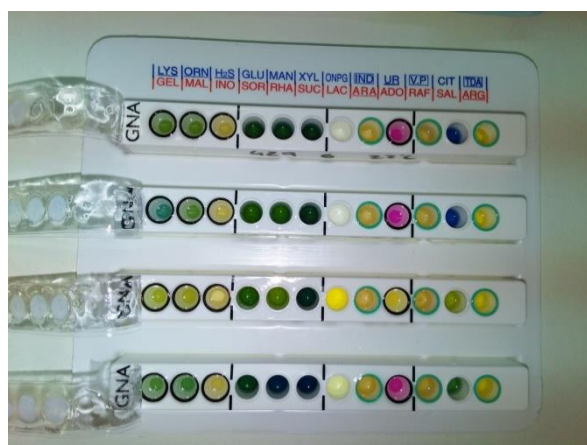


Fig. 17 – Identificação bioquímica para *Legionella*

A identificação é obtida através de um perfil numérico, que posteriormente é procurado na lista do programa de identificação. Após a identificação de *Legionella*, no programa, procede-se ao teste de serologia onde se fazem, em primeiro lugar, os controlos dos reagentes.

Para o Controlo Positivo é colocado num poço do cartão de aglutinação 1 gota de Controlo Positivo e 1 gota de Reagente Teste 1, sendo misturadas bem com uma ansa, rodando suavemente o cartão de aglutinação. É observada a reacção positiva de aglutinação em 2 minutos. O processo é repetido para os restantes reagentes (Reagente Teste 2-15 e Reagente Teste Espécies).

Para o Reagente de Controlo (Controlo Negativo) é colocado num poço do cartão de aglutinação 1 gota de Solução Salina e 1 gota de Reagente Teste 1, sendo bem misturadas com uma ansa, rodando suavemente o cartão de aglutinação. É observada a reacção negativa de aglutinação em 2 minutos. O processo é repetido para os restantes reagentes (Reagente Teste 2-15 e Reagente Teste Espécies).

Feito o controlo da qualidade dos reagentes, procede-se à realização do ensaio sendo adicionada uma gota de solução tampão em 3 poços independentes do cartão de aglutinação. São repicadas 3 a 4 colónias e misturadas com o tampão até ser obtida uma solução homogénea. São adicionados os Reagentes Teste 1, Teste 2-15 e

Teste Espécies (um em cada poço), e misturados gentilmente com a solução homogênea fazendo movimentos giratórios suaves durante 2 minutos para ser observada a ocorrência (ou ausência) de aglutinação (ver Fig. 18 e 19).



Fig. 18 – Controle dos reagentes



Fig. 19 – Confirmação do tipo de *Legionella*

O resultado é positivo se ocorrer aglutinação, indicando que a amostra tem antígenos do serogrupo em questão. O resultado é negativo se não ocorrer aglutinação.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colônias por volume testado.

1.9-Salmonella sp. (ISO 19250:2010):

Neste ensaio são consideradas como suspeitas as colônias com as seguintes características:

- em meio XLD: normalmente com centro negro e zona transparente (por vezes avermelhada);
- em meio Verde Brilhante: cor vermelho a rosa claro opaco com halo vermelho.

Para as provas de confirmação é necessário retirar 1 colônia característica de cada meio para confirmação, e caso esta não seja confirmada como *Salmonella sp.*, são repicadas mais 4 colônias características de cada meio para PCA, sendo as placas incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.

Após a incubação, as colónias são repicadas para tubos do meio TSI (com picada central e isolamento na rampa) e são incubados a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Para ser feita a confirmação bioquímica, é utilizada uma galeria de identificação. Feita a confirmação bioquímica, é realizada a confirmação serológica: a detecção da presença de *Salmonella* O-, Vi- e H-antígenos através de testes de aglutinação.

A interpretação das alterações no meio TSI encontra-se na tabela seguinte:

Tabela 54 – Interpretação dos tubos TSI

APARÊNCIA	INTERPRETAÇÃO
Fundo do tubo	
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_2S
Bolhas e abertura	Formação de gás a partir da fermentação da glucose
Rampa na superfície	
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)

Só são consideradas como *Salmonella sp.*, as colónias que em TSI apresentem a rampa com cor vermelha ou sem alteração de cor do meio, formação de gás (bolhas) e fundo do tubo com cor amarela, com (em 90% dos casos) formação de H_2S (cor negra no tubo) ou no caso das *Salmonella* lactose positiva a rampa também apresenta cor amarela, sendo a identificação desta estirpe dada pela galeria de identificação bioquímica e pelos testes de serologia.

Na galeria de identificação de bactérias (Microgen-A), tal como acontece para a identificação de *Legionella*, é colocada uma colónia em 3 mL de solução salina. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur são colocadas 3 a 4 gotas por poço, cobrindo os poços 1, 2, 3 e 9 com óleo de imersão. A galeria é tapada com a película que a acompanha e é incubada a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas. O teste da oxidase é efetuado em separado e é anotado o resultado.

Após a incubação, são adicionados os reagentes necessários em alguns testes e a leitura é efetuada através do programa:

- no poço 8: são adicionadas 2 gotas de reagente de Kovacs, e o resultado é lido após 60 segundos;
- no poço 10: é adicionada 1 gota de VPI e 1 gota de VPII, e o resultado é lido após 15-30 minutos;
- no poço 12: é adicionada 1 gota de TDA, e o resultado é lido após 60 segundos.

A identificação é obtida através de um perfil numérico, que posteriormente é procurado na lista do programa de identificação. Se o programa identificar a colônia como *Salmonella sp.*, então é feito o teste de serologia.

Inicialmente são sempre realizados os controlos dos reagentes para comprovar que não estão contaminados e podem ser utilizados.

Para o Controlo dos Reagentes, é colocado num mesmo círculo do cartão de aglutinação 1 gota do Reagente de Teste e 1 gota do Reagente de Solução Salina, sendo misturados e espalhados por toda a área do círculo. O cartão é rodado suavemente durante 2 minutos para se observar a aglutinação.

Para o Controlo Positivo, é colocado num círculo do cartão de aglutinação 1 gota de Reagente de Controlo Positivo, sendo adicionado no mesmo círculo uma gota do Reagente de Teste e misturado, realizando movimentos giratórios suaves durante 2 minutos para observar a aglutinação.

Feitos os controlos de todos os reagentes, é efetuado o ensaio onde é adicionada uma gota de Reagente de Solução Salina num círculo do cartão de aglutinação, e uma colônia é repicada e inoculada na gota de Reagente de Solução Salina, de forma a obter uma suspensão homogênea. O cartão de aglutinação é rodado suavemente durante 2 minutos para observar autoaglutinação. No mesmo círculo é adicionada 1 gota do Reagente de Teste e, depois de misturado e rodado durante 2 minutos, é verificada a ocorrência (ou ausência) de aglutinação.

O resultado é positivo se ocorrer aglutinação, indicando a presença de *Salmonella sp.*, e é negativo se não ocorrer aglutinação, indicando a ausência de *Salmonella sp.*

O resultado final é expresso como *Salmonella* presuntiva ou confirmada, presente ou ausente no volume de amostra testado.

1.10-Fungos (SMEWW 9610 D:2005):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 10 colónias e menos de 100, por observação à lupa esterioscópica com ampliação de 10x, e são consideradas como colónias de fungos todas as presentes na placa, não necessitando de provas de confirmação.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume filtrado e quando o número de colónias é >100 o resultado é dado como >100.

1.11-*Mycobacterium* sp. (SMEWW 9260 M:2005):

Neste ensaio são consideradas como colónias características, as de cor amarelo pálido a amarelo forte, com morfologia lisa ou em “couve-flôr” (ver Fig. 9); uma eventual viragem do meio de cultura a azul turquesa é consequência da presença de colónias de outra origem bacteriana ou fúngica. Para colónias características é necessário efetuar a coloração com o método Ziehl-Nielsen (ver Fig. 18).



Fig. 18 - *Mycobacterium*

No método Ziehl-Nielsen, o esfregaço é coberto com a solução de Fucsina e é deixado em contacto durante 3 minutos (ver Fig. 19). Logo após, é lavado suavemente com água (ver Fig. 20) e coberto com a solução de Azul de metileno, deixando em contacto durante 1 minuto (ver Fig. 21). Por fim é lavado suavemente com água (ver Fig. 22) e deixado a secar para ser observado ao microscópio. O *Mycobacterium* sp é

visualizado sob a forma de bacilos corados a vermelho. Se as colónias forem confirmadas, são identificadas num Laboratório externo.



Fig. 19 – Solução de Fucsina



Fig. 20 – Lavagem da solução de Fucsina



Fig. 21 – Solução de Azul Metileno



Fig. 22 – Lavagem da solução de Azul Metileno

O resultado é expresso como presença ou ausência do microrganismo no volume de amostra testado.

CÁLCULOS PARA AS ÁGUAS

Os cálculos para as águas são efetuados da mesma forma, com a exceção da *Salmonella sp.* que é um ensaio de presença/ausência. Os cálculos que serão apresentados a seguir, se não estiverem presentes nas normas de cada ensaio, são retirados da ISO 7218.

Os resultados são calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$n = (c / vt) \times vr$$

em que:

- c = somatório das colónias (várias filtrações, diluições...)
- v_r = volume de expressão do resultado
- v_t = volume de amostra filtrada; no caso de haver diluições $v_t = \Sigma[(p_1 \times v_1 \times d_1) + [(p_2 \times v_2 \times d_2) + \dots]]$
 - onde p = nº de placas, v = volume de amostra filtrada, d = diluição da contagem

Após a identificação de colónias efetua-se o seguinte cálculo:

$$c = (a / b) \times A$$

em que:

- a = nº colónias identificadas
- b = nº de colónias a identificar
- A = nº de colónias totais (presuntivas)

No caso específico da *Legionella* sp. ISO 11731, sendo n o resultado por volume de amostra filtrada/ centrifugada:

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

em que:

- c = número de colónias confirmadas
- v_r = volume de ressuspensão
- v_i = volume de inoculo

A expressão dos resultados, por conseguinte, quando são utilizadas diluições, é arredondada a dois algarismos significativos e é expressa 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 no caso de diluições (ex: $< 1,0 \times 10^1$) e zero no caso de leitura directa.

Quando há leitura directa de colónias, o resultado é dado pelo número de colónias por unidade de volume.

Relativamente à incorporação, quando o número de colónias é > 300 , o resultado é dado como > 300 .

Relativamente ao espalhamento, quando o número de colónias é > 150, o resultado é dado como > 150.

Quanto à filtração, quando o número de colónias é > 100, o resultado é dado como > 100.

Exemplos de resultados para diferentes águas

Depois de serem efetuados os cálculos na sua totalidade, os valores obtidos são colocados na Lista de Trabalho que contém cada amostra e os respectivos parâmetros analisados, como se pode ver pelos exemplos referidos a seguir. A maior parte dos resultados que são colocados na Lista de Trabalho não foram feitos por mim mas sim pela responsável do departamento de microbiologia, sendo ela também a submeter os relatórios, num programa informático específico, que são enviados para os clientes.

Tabela 55 – Resultado de uma água de consumo

Legislação: Decreto-Lei nº 306/2007		
Água de Consumo : R1 + R2 + Inspeção		
Análises efetuadas		Resultados
Microrganismos a 36°C		14 ufc/mL
Microrganismos a 22°C		10 ufc/mL
Bactérias coliformes	Azul escuro/violeta: 10 Rosa/vermelho: 32 Nº rosa/vermelho a confirmar: 10 Oxidase - : 10	42 ufc/100 mL
Escherichia coli	Azul escuro/violeta: 10	10 ufc/100 mL
Enterococos intestinais	Vermelho/castanho/rosa: 23 Esculina +: 23 +	23 ufc/100 mL
Clostridium perfringens	Nº amarelas: 0 Amónia:	0 ufc/100 mL

Relativamente aos resultados obtidos, para a água de consumo, presentes na Tabela 55, é possível verificar que, em todos os parâmetros analisados, os valores se encontram dentro dos limites segundo o Decreto-Lei nº 306/2007. Assim esta água é considerada conforme.

Tabela 56– Resultado de uma água de consumo

Legislação: Decreto-Lei nº 306/2007		
Água de Consumo : R1 + R2		
Análises efetuadas		Resultados
Microrganismos a 36°C		>300 ufc/mL
Microrganismos a 22°C		>300 ufc/mL
Bactérias coliformes	Azul escuro/violeta: 5 Rosa/vermelho: >100 Nº rosa/vermelho a confirmar: 10 Oxidase - : 6	>100 ufc/100 mL
Escherichia coli	Azul escuro/violeta: 5	5 ufc/100 mL
Clostridium perfringens	Nº amarelas: 0 Amónia:	0 ufc/100 mL

Relativamente aos resultados obtidos, para a água de consumo, presentes na Tabela 56, é possível verificar que nos parâmetros das bactérias coliformes, *E. coli* e *C. perfringens* os valores se encontram dentro dos limites de contagem e quantificação quando comparados com o Decreto-Lei nº306/2007. No entanto, para os microrganismos a 36°C e 22°C, apesar de serem valores elevados, os valores paramétricos não têm um valor limite para estes microrganismos, logo esta água está conforme.

Tabela 57 – Resultado de uma água de piscina

Legislação: Decreto Regulamentar nº 5/97 /Direção Geral de Saúde – CN nº14/DA e PVS piscinas		
Água de Piscina		
Análises efetuadas		Resultados
Microrganismos a 36°C		>300 ufc/mL
Bactérias coliformes	Azul escuro/violeta: 0 Rosa/vermelho: 48 Nº rosa/vermelho a confirmar: 10 Oxidase - : 8	38 ufc/100mL
Escherichia coli	Azul escuro/violeta: 0	0 ufc/100mL

Enterococos intestinais	Vermelho/castanho/rosa: 39 Esculina +: 39 +	39 ufc/100mL
Pseudomonas aeruginosa	Azul/verde: Fluorescente: Castanho/vermelho: Amônia: Oxidase +: Fluorescência:	0 ufc/100mL
Estafilococos coagulase +	Nº amarela a confirmar: 3 Coagulase +: 3 Nº branca a confirmar: - Coagulase +: -	>100 ufc/100mL
Total de estafilococos	Amarela: >100 Nº a confirmar: 3 cocosG+: 3 Catalase+: 3 Tresp+: 3 Branca: 0 Nº a confirmar: cocosG+: Catalase+: Tresp+:	>100 ufc/100mL

Relativamente aos resultados obtidos, para a água de piscina, presentes na Tabela 57, é possível verificar que nos parâmetros de *E. coli* e *P. aeruginosa*, segundo a Decreto Regulamentar nº 5/97 / Direção Geral de Saúde – CN nº14/DA e PVS piscinas, os valores se encontram dentro dos limites de contagem e quantificação. No entanto, para os restantes parâmetros, os valores encontram-se superiores ao limite máximo de contagem e quantificação, logo, esta água de piscina está não conforme.

Tabela 58 – Resultado de uma água para identificação de *Legionella sp.*

Legislação: Portaria nº 1220/2000					
Água Termal – Legionella sp.					
Análises efetuadas					Resultados
Legionella sp.	2ºdia: 0	6ºdia: 0	10ºdia: 0	Columbia: -	0 ufc/1000 mL

Relativamente aos resultados obtidos, para a água termal com o intuito de pesquisar *Legionella sp.*, presentes na Tabela 58, é possível verificar que, segundo a Portaria nº1220/2000, os valores se encontram dentro dos limites de contagem e quantificação. Assim, com a ausência de *Legionella sp.*, esta água está conforme.

Tabela 59 – Resultado de uma água para identificação *Mycobacterium sp.*

Legislação: Requisito do cliente	
Mycobacterium sp.	
Análises efetuadas	Resultados
Mycobacterium sp.	Ausente ufc/1000 mL

Relativamente aos resultados obtidos, para a identificação de *Mycobacterium* sp., presentes na Tabela 59, é possível verificar que, segundo os requisitos de cliente, esta bactéria está ausente da água analisada, tornando-a a assim conforme.

2-ALIMENTOS E ZARAGATOAS

2.1- Microrganismos a 30°C (ISO 4833:2013–alimentos;ISO 18593:2004 (8 e 9)-zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 300, não sendo necessário provas de confirmação (ver Fig. 23).



Fig. 23 – Microrganismos em PCA

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.2-Bactérias coliformes a 30°C (ISO 4832:2006-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 150, sendo consideradas como bactérias coliformes, as colónias com cor vermelha-violeta, por vezes rodeada por uma zona avermelhada de precipitação e como colónias suspeitas de bactérias coliformes, as atípicas (tamanho < 0,5mm) e derivadas de lactícínios que possuam outros açúcares para além da lactose.

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.3-*Escherichia coli* (ISO 16649-1:2001-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9)-zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 150 típicas, e menos de 300 totais (típicas e não típicas). São consideradas como *Escherichia coli* as colónias com cor azul/ verde não sendo necessário provas de confirmação.

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.4-*Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2004-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 150. São consideradas como colónias suspeitas de *Enterobacteriaceae* as que apresentarem cor rosa a vermelho ou roxo, com ou sem halo de precipitação. Algumas

Enterobacteriaceae podem causar descoloração das suas colónias no meio. Por este motivo quando não estiverem presentes na placa colónias características, escolher 5 colónias esbranquiçadas para confirmação.

Para as provas de confirmação são marcadas as placas de Petri com o nº interno, diluição, data, identificação do meio de cultura e temperatura de incubação, sendo então repicadas 5 colónias características para PCA, e incubadas as placas invertidas a 37°C durante 24±2h. Após o período de incubação são realizados os testes da oxidase e da fermentação da glucose.

Teste da oxidase

Como já foi explicado anteriormente, a reacção de oxidase é positiva quando há produção de cor azul-púrpura após 10 segundos.

Teste da fermentação da glucose

Para este teste, só são seleccionadas as colónias oxidase-negativa e repicadas posteriormente para tubos de Purple Glucose agar. Os tubos são incubados a 37°C durante 24±2h. A fermentação da glucose é observada pelo desenvolvimento de coloração amarela ao longo do tubo.

São então consideradas como *Enterobacteriaceae* as colónias oxidase-negativas e que fermentem a glucose.

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.5-Estafilococos coagulase-positiva (ISO 6888-1:1999-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 150, sendo consideradas como colónias características, suspeitas de Estafilococos coagulase-positiva as de cor preta ou cinzenta, brilhantes, convexas e rodeadas por uma zona clara (um anel opalescente pode aparecer nesta zona clara). As colónias

não características, suspeitas de *Estafilococos* coagulase-positiva apresentam cor preta brilhante com ou sem uma fina extremidade branca; zona clara impercetível ou inexistente (anel opalescente também imperceptível ou inexistente) ou cor cinzenta sem zona clara (ver Fig. 20).



Fig. 24 – *Estafilococos* coagulase positiva

Para as provas de confirmação são selecionadas 5 colónias características e 5 colónias não características, caso existam e são realizados dois testes: coloração de Gram e teste da coagulase.

Coloração de Gram

Como foi referido anteriormente, esta técnica de coloração das células bacterianas 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. Esta divisão dos resultados advém das diferenças de estrutura da parede celular dos dois grupos e correlaciona-se com outras grandes diferenças. Para a realização desta técnica, primeiramente, os reagentes são deixados a atingir a temperatura ambiente. De seguida é realizado um esfregaço com a colónia em estudo e é fixada à lâmina, sendo logo após coberta com o corante Cristal Violeta. Depois de deixar reagir por 1 minuto, a lâmina é enxaguada gentilmente durante alguns segundos com água e coberta com o fixante Lugol, onde é deixado a reagir por 1 minuto também. De seguida a lâmina é enxaguada durante alguns segundos com água e depois é vertido sobre o esfregaço gentilmente e continuamente etanol (95 %), nunca por um período superior a 30 segundos e até não ser visível a cor violeta. A lâmina é enxaguada novamente durante alguns segundos com água, de forma a eliminar o etanol e é coberta por último com o corante Safranina

durante 1 minuto. Por fim, a lâmina é enxaguada com água e é deixada a secar antes de ser visualizada no microscópio na objetiva de imersão (óleo de imersão).

Teste da coagulase (por aglutinação)

Só é realizado o teste da coagulase se, através da coloração de Gram, forem observados cocos Gram+. pós os reagentes atingirem a temperatura ambiente, numa carta descartável, é colocado num dos círculos 1 gota de R1 (reagente da coagulase) e no outro uma gota de R2 (controlo negativo). As colónias suspeitas são inoculadas nos reagentes e misturadas cuidadosamente durante 10 segundos. É dado à carta um ligeiro movimento rotativo durante 20 segundos para ser possível ler a reacção. Um resultado positivo é indicado pelo aparecimento com o reagente R1 de uma aglutinação (aglomerado de pequenas massas) em 30 segundos. Um resultado negativo é indicado pela ausência de aglutinação com os reagentes R1 e R2.

São considerados como Estafilococos coagulase-positiva as colónias que sejam coagulase-positiva.

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.6-Bactérias sulfito-redutoras (ISO 15213:2003-alimentos):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 150, sendo consideradas como colónias de bactérias sulfito-redutoras as de cor negra e por vezes rodeadas por uma zona negra. Não são necessárias provas de confirmação.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

2.7-*Clostridium perfringens* (ISO 7937:2004-alimentos):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 300, sendo consideradas como colónias suspeitas de *Clostridium perfringens* as de cor negra e por vezes rodeadas por uma zona negra.

Como este ensaio não se faz com tanta frequência, não tive oportunidade de realizar as provas de confirmação relativas a este microrganismo, no entanto, são seleccionadas 5 colónias características, bem isoladas e são realizados os seguintes testes: redução dos nitratos, mobilidade e fermentação da lactose. No caso de não haver colónias bem isoladas são repicadas 5 colónias para meio fluído Thioglycollate e é incubado em anaerobiose a 37°C durante 18 a 24 horas. Após incubação, as colónias são repicadas para placas de TSC e é adicionada uma nova camada de 10 mL de TSC. As placas são incubadas invertidamente em anaerobiose a 37°C durante 18 a 24 horas.

Teste nitrato-mobilidade

Neste teste são inoculadas cada uma das colónias em nitrate-motility medium por picada central e os tubos são incubados em anaerobiose a 37°C durante 24h. Após incubação é observado se houve crescimento para fora da zona da picada (crescimento ao longo do meio, fora da zona da picada evidencia a mobilidade) e é testada a presença de nitritos adicionando 0,2 a 0,5 mL de reagente para detecção de nitritos. No final, é observada a formação de coloração vermelha. Caso não se observe formação de coloração vermelha durante 15 minutos, é adicionado pó de zinco e deixado a reagir por 10 minutos (se houver aparecimento de coloração vermelha, indica que não houve redução dos nitratos).

Teste da degradação da lactose e liquefacção da gelatina

Neste teste, cada uma das colónias é inoculada em lactose-gelatin médium e depois incubado em condições anaeróbias a 37°C durante 24h. Após incubação, é observada formação de cor amarela e bolhas de gás. Os tubos são depois arrefecidos a 5°C durante 1h para liquefazer a gelatina.

No final das provas de confirmação, são consideradas como colónias de *Clostridium perfringens* as imóveis, que reduzem os nitratos (cor vermelha ao adicionar reagente para pesquisa de nitratos ou não formação de cor após adicionar

pó de zinco), degradam a lactose produzindo ácido (coloração amarela) e gás (bolhas de gás) e liquefazem a gelatina em 48 horas.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

2.8-Salmonella (ISO 6579:2002-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9)-zaragatoas):

Neste ensaio, tal como acontece para a *Salmonella* em água, são consideradas como suspeitas de *Salmonella* as colónias com as seguintes características:

- em meio XLD: normalmente com centro negro e zona transparente (por vezes avermelhada) (ver Fig. 25);
- em meio Verde Brilhante: cor vermelha a rosa claro opaco com halo vermelho (ver Fig. 26).

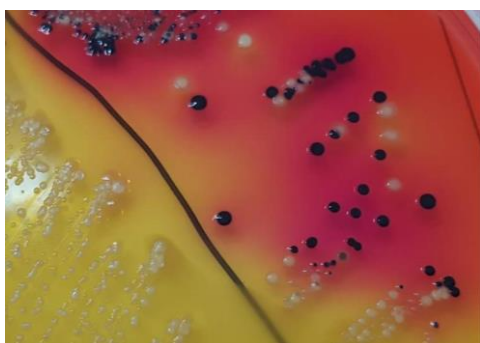


Fig. 25 – *Salmonella* em meio XLD



Fig. 26 - *Salmonella* em meio VB

Para as provas de confirmação é necessário retirar 1 colónia característica de cada meio para confirmação, e caso esta não seja confirmada como *Salmonella sp.*, são repicadas mais 4 colónias características de cada meio para PCA, sendo as placas incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.

Após a incubação, as colónias são repicadas para tubos do meio TSI (com picada central e isolamento na rampa) e são incubados a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Para ser feita a confirmação bioquímica, é utilizada uma galeria de identificação. Feita a confirmação bioquímica, é realizada a confirmação serológica: a detecção da presença de *Salmonella* O-, Vi- e H-antígenos através de testes de aglutinação.

A interpretação das alterações no meio TSI encontra-se na tabela seguinte:

Tabela 60 – Interpretação dos tubos TSI

APARÊNCIA	INTERPRETAÇÃO
Fundo do tubo	
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 ₂ S
Bolhas e abertura	Formação de gás a partir da fermentação da glucose
Rampa na superfície	
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)

Só são consideradas como *Salmonella* sp., as colônias que em TSI apresentem a rampa com cor vermelha ou sem alteração de cor do meio, formação de gás (bolhas) e fundo do tubo com cor amarela, com (em 90% dos casos) formação de H₂S (cor negra no tubo) ou no caso das *Salmonella* lactose positiva a rampa também apresenta cor amarela (ver Fig. 27), sendo a identificação desta estirpe dada pela galeria de identificação bioquímica e pelos testes de serologia.



Fig. 27 - Tubos de TSI para confirmação de *Salmonella*

Na galeria de identificação de bactérias (Microgen-A) (ver Fig. 28), tal como acontece para a identificação de *Legionella*, é colocada uma colônia em 3 mL de solução salina. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur são colocadas 3 a 4 gotas por poço, cobrindo os poços 1, 2, 3 e 9 com óleo de imersão. A galeria é tapada com a película que a acompanha e é incubada a 35-37°C durante 18 a 24 horas (ver Fig. 29). O teste da oxidase é efetuado em separado e é anotado o resultado.

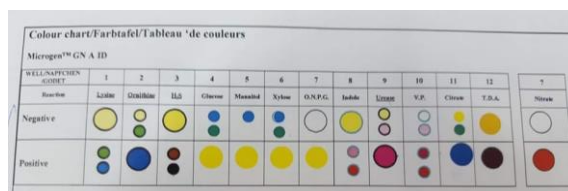


Fig. 28 – Microgen-A



Fig. 29 - Identificação bioquímica de *Salmonella*

Após a incubação, são adicionados os reagentes necessários em alguns testes e a leitura é efetuada através do programa:

- no poço 8: são adicionadas 2 gotas de reagente de Kovacs, e o resultado é lido após 60 segundos;
- no poço 10: é adicionada 1 gota de VPI e 1 gota de VP II, e o resultado é lido após 15-30 minutos;
- no poço 12: é adicionada 1 gota de TDA, e o resultado é lido após 60 segundos.

A identificação é obtida através de um perfil numérico, que posteriormente é procurado na lista do programa de identificação (ver Fig. 30). Se o programa identificar a colónia como *Salmonella sp*, então é feito o teste de serologia.

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No. 119573 XCO Specimen Type: Date: 05.08.16

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
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	4	2	1
Sum of Positive Reactions	0	7	7	0	2																						

Octal Code: 7702 Final Identification: Salmonella

WF6125/08/03

Fig. 30 – Identificação de *Salmonella* no programa informático

Inicialmente são sempre realizados os controlos dos reagentes para comprovar que não estão contaminados e podem ser utilizados.

Para o Controlo dos Reagentes, é colocado num mesmo círculo do cartão de aglutinação 1 gota do Reagente de Teste e 1 gota do Reagente de Solução Salina, sendo misturados e espalhados por toda a área do círculo. O cartão é rodado suavemente durante 2 minutos para se observar a aglutinação.

Para o Controlo Positivo, é colocado num círculo do cartão de aglutinação 1 gota de Reagente de Controlo Positivo, sendo adicionado no mesmo círculo uma gota do Reagente de Teste e misturado, realizando movimentos giratórios suaves durante 2 minutos para observar a aglutinação.

Feitos os controlos de todos os reagentes, é efetuado o ensaio onde é adicionada uma gota de Reagente de Solução Salina num círculo do cartão de aglutinação, e uma colónia é repicada e inoculada na gota de Reagente de Solução Salina, de forma a obter uma suspensão homogénea. O cartão de aglutinação é rodado suavemente durante 2 minutos para observar autoaglutinação. No mesmo círculo é adicionada 1 gota do Reagente de Teste e, depois de misturado e rodado durante 2 minutos, é verificada a ocorrência (ou ausência) de aglutinação (ver fig. 31).



Fig. 31 – Verificação de aglutinação confirmando presença de *Salmonella*

O resultado é positivo se ocorrer aglutinação, indicando a presença de *Salmonella sp.*, e é negativo se não ocorrer aglutinação, indicando a ausência de *Salmonella sp.*

No caso dos alimentos, o resultado final é expresso como *Salmonella* presuntiva ou confirmada, presente ou ausente no volume de amostra testado.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.9-Bolores e Leveduras (ISO 21527-1:2008-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9) - zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 300, sendo consideradas como Leveduras as colónias redondas de cor mate ou brilhante, com traçado regular e superfície convexa e são consideradas como Bolores as colónias achatadas ou “fofas” (em estrutura de algodão) com estruturas esporuladas (ver Fig. 32 e 33). Não necessita de provas de confirmação.

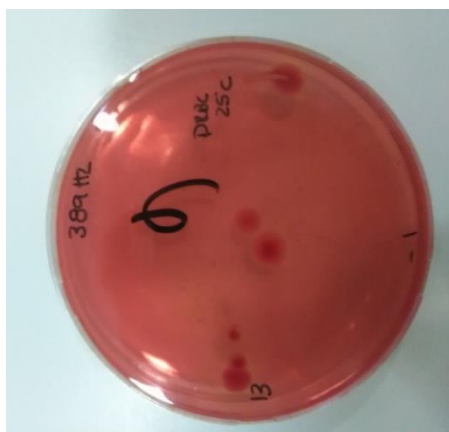


Fig. 32 – Leveduras em meio DRBC



Fig. 33 – Leveduras em meio DRBC

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.10-Bacillus cereus (ISO 7932:2004 - alimentos; ISO 18593 :2004(8 e 9) - zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 150, sendo consideradas como colónias suspeitas de *Bacillus cereus* as largas, rosa e geralmente rodeadas por um halo de precipitação.

Para as provas de confirmação, são seleccionadas 5 colónias características, repicadas para PCA e as placas são incubadas invertidas em aerobiose a 30°C durante 24 horas. Caso não existam colónias características bem isoladas, são repicadas novamente as 5 colónias para MYP e incubadas as placas invertidas em aerobiose 30°C durante 18 a 24 horas. As colónias são depois repicadas para meio de cultura Columbia 5% e são incubadas as placas invertidas em aerobiose a 30±1°C durante 24±2h.

São consideradas como colónias de *Bacillus cereus* as que apresentem hemólise.

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.11-*Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2/Amd.1:2004-alimentos; ISO 18593:2004 (8 e 9)-zaragatoas):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 150, sendo consideradas como colónias suspeitas de *Listeria sp.* as de cor verde-azul, com ou sem halo opaco e são consideradas como colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* as de cor verde-azul, rodeadas por um halo opaco.

Para as provas de confirmação, são seleccionadas 5 colónias características, repicadas para PCA e incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas. São realizados os seguintes testes: teste da catalase, coloração de Gram, teste da hemólise, utilização de carboidratos e teste de CAMP. No entanto, não tive oportunidade de realizar estas provas de confirmação.

Teste de catalase

Neste teste, como já foi referido anteriormente, a reacção de catalase é positiva pela produção de bolhas de oxigénio.

Coloração de Gram

É realizada a coloração de Gram, que já foi explicado anteriormente, sendo selecionadas as colónias Gram positivas com forma de espirais curtos.

Teste da hemólise

Para o teste da hemólise, são repicadas as colónias para Columbia 5%, sendo repicadas também colónias para controlo positivo e negativo. As placas invertidas são incubadas a 37°C durante 24±2h e depois é comparada a reacção das colónias aos controlos.

Utilização dos carboidratos

Para testar a utilização dos carboidratos, são repicadas as colónias para os tubos de Rhamnose test e Xylose teste. Estes são incubados a 37°C durante 5 dias (reacções positivas verificam-se normalmente em 24 a 48 horas).

Teste de CAMP

Para o teste de CAMP, é inoculado o *Staphylococcus aureus* desenhando uma linha vertical no meio de Columbia a 5%. As amostras a testar e o controlo positivo são inoculados, desenhando uma linha horizontal que se prolongue até ficar a 1 ou 2 mm do inóculo de *Staphylococcus aureus*. As placas são incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas.

Após as provas de confirmação, são consideradas como *Listeria sp.* as colónias com reacção positiva no teste da catalase e que sejam bastonetes finos em forma de espiral Gram+, e são consideradas como *Listeria monocytogenes* as colónias que realizem hemólise, degradem a rhamnose e a xylose e que apresentem uma reacção positiva com *Staphylococcus aureus*, ou seja, o 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*

No caso dos alimentos, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

No caso das zaragatoas, o resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por zaragatoa quando a área não é conhecida, e é expresso em unidades formadoras de colónias por cm³ quando a área é conhecida.

2.12-Microrganismos psicrótrócos (NP 2307:1987-alimentos):

Neste ensaio são seleccionadas as placas com mais de 15 colónias e menos de 300, não sendo necessário provas de confirmação.

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro ou grama.

CÁLCULOS PARA ALIMENTOS E ZARAGATOAS

Os cálculos são efetuados da mesma forma para cada microrganismo. Tanto para os alimentos como para as zaragatoas os cálculos são os mesmos.

Caso não seja especificado por cada ensaio, o resultado é calculado de acordo com a ISO 7218 como estará descrito de seguida. Estando representado como c, o nº de colónias presentes, ficam definidas como c as 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 = nº 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 = nº colónias identificadas, b = nº de colónias a identificar (a efetuar provas de confirmação) e A = nº de colónias totais (presuntivas de serem confirmadas)
- c em zaragatoas = nº de colónias x volume total do líquido da zaragatoa de colheita

Cálculo com colónias em diluições sucessivas unitárias:

$$n = \frac{c}{v \times 1,1 \times d}$$

em que:

- v = volume de inoculo
- d = diluição correspondente à 1ª placa com contagens

Cálculo com colónias ≥ 4 e < 10 em diluições sucessivas unitárias:

$$n = \frac{c}{v \times d}$$

em que:

- v = volume de inoculo
- d = diluição correspondente às placas com contagens

Cálculo com colónias em diluições sucessivas em duplicado:

$$n = \frac{c}{v \times [n1 + (0,1 \times n2)] \times d}$$

em que:

- v = volume de inoculo
- d = diluição correspondente às 1ª placas com contagens
- n1 = nº de placas com colónias na 1ª diluição
- n2 = nº de placas com colónias na 2ª diluição

Cálculo com colónias ≥ 4 e < 10 diluições sucessivas em duplicado:

$$n = \frac{c}{v \times n \times d}$$

em que:

- v = volume de inoculo
- d = diluição correspondente às placas com contagens
- n = nº de placas com colónias

Cálculo com colónias apenas na última diluição unitária:

$$n = \frac{c}{v \times d}$$

em que:

- v = volume de inoculo
- d = diluição correspondente à placa com contagens

Cálculo com colónias apenas na última diluição em duplicado:

$$n = \frac{c}{v \times n \times d}$$

em que:

- v = volume de inoculo
- d = diluição correspondente à placa com contagens
- n = nº de placas com colónias

Cálculo com colónias > 300 (ou >150) na 1ª diluição e < 10 na 2ª diluição (unitário ou duplicado), de acordo com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança:

- $d_1 < 324$ e $d_2 < 12$, o resultado não é aceitável
- $d_1 < 324$ e $d_2 > 12$, utilizar apenas o valor de d_2
- $d_1 > 324$ e $d_2 < 12$, o resultado não é aceitável
- $d_1 > 324$ e $d_2 > 12$, utilizar apenas o valor de d_2
- $d_1 > 167$ e $d_2 < 7$, o resultado não é aceitável
- $d_1 > 167$ e $d_2 > 7$, utilizar apenas o valor de d_2

Caso não seja especificado por cada ensaio, a expressão do resultado deve ser feita de acordo com,

- 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

- para o caso de valores de colónias entre 1 e 3 na primeira diluição (d) o resultado é apresentado como “microrganismos presentes mas em quantidade < 4/d”
- para o caso de valores de colónias > valor máximo de contagem na última diluição, apresentar o resultado como “> valor calculado” (ex: > 1,0 x 10⁴)
- para ensaios de presença/ ausência, o resultado é expresso como “presente” e “ausente”, respectivamente.

Exemplos de resultados para diferentes alimentos

Depois de serem efetuados os cálculos na sua totalidade, os valores obtidos são colocados na Lista de Trabalho que contém cada amostra e os respectivos parâmetros analisados, como se pode ver pelos exemplos referidos a seguir. A maior parte dos resultados que são colocados na Lista de Trabalho e respectivos cálculos, não foram feitos por mim mas sim pela responsável do departamento de microbiologia, sendo ela também a submeter os relatórios, num programa informático específico, que são enviados para os clientes.

Tabela 61 – Resultado de uma refeição pronta a comer

Legislação: Valor Guia INSA – Grupo 1					
Bacalhau com natas (ultracongelado)					
Análises efetuadas					Resultados
Bactérias coliformes	Vermelho/violeta -1: 0	-2: 0	-3:	-4:	< Limite de quantificação ufc/g
	Atípicas -1: -	-2: -	-3:	-4:	
	Nº a confirmar:	Glucose+:			
Bolores	-1: 0	-2: 0	-3:	-4:	< Limite de quantificação ufc/g
Leveduras	-1: 1	-2: 0	-3:	-4:	Microrganismos presentes <4,0 x 10 ² 1,0 x 10 ² ufc/g
Microrganismos a 30°C	-1: 131	-2: 15	-3:	-4:	1,3 x 10 ³ ufc/g
Escherichia coli	Tempo de incubação 18 a 24h: 19h				< Limite de quantificação ufc/g
	-1: 0	-2: 0	-3:	-4:	

Estafilococos coagulase +	-1: 0 -2: 0 -3: -4:	< Limite de quantificação ufc/g
	Nº a confirmar: Coagulase+:	
Salmonella sp.	Tempo de incubação APT 16 a 20h: 19h	Presente ufc/25g
	4 XLD (negro/transp.):4 4 VB (verm/rosa halo): 4	
	TSI: Tubos todos amarelos indicando a fermentação dos açúcares; bolhas e abertura indicando formação de gás a partir da fermentação da glucose	
	Galeria BQ: Salmonella 80,89%, segundo programa informático	
	Serologia: Presença de aglutinação	

Relativamente aos resultados obtidos, para o prato confeccionado, presentes na Tabela 61, é possível verificar que em todos os parâmetros, com a exceção de *Salmonella sp.*, os valores se encontram dentro dos limites de quantificação quando comparados com o Valor Guia INSA – Grupo 1. No entanto, esta refeição apresenta um resultado positivo para a presença de *Salmonella sp.*, pelo que assim está não conforme.

Tabela 62 – Resultado de uma refeição pronta a comer

Legislação: Valor Guia INSA – Grupo 1		
Arroz de pato (ultracongelado)		
Análises efetuadas		Resultados
Bactérias coliformes	Vermelho/violeta -1: 0 -2: 0 -3: -4: Atípicas -1: - -2: - -3: -4: Nº a confirmar: Glucose+:	< Limite de quantificação ufc/g
Bolores	-1: 0 -2: 0 -3: -4:	< Limite de quantificação ufc/g
Leveduras	-1: 1 -2: 0 -3: -4:	Microrganismos presentes <4,0 x 10 ² 1,0 x 10 ² ufc/g
Microrganismos a 30°C	-1: >300 -2: >300 -3: 74 -4:	7,4 x 10 ⁴ ufc/g
Escherichia coli	Tempo de incubação 18 a 24h: 19h -1: 0 -2: 0 -3: -4:	< Limite de quantificação ufc/g

Estafilococos coagulase +	-1: 0 -2: 0 -3: -4:	< Limite de quantificação ufc/g
	Nº a confirmar: Coagulase+:	
Salmonella sp.	Tempo de incubação APT 16 a 20h: 19h	Ausente ufc/25g
	4 XLD (negro/transp.): 0 4 VB (verm/rosa halo): 0	
	TSI: -	
	Galeria BQ: -	
	Serologia: -	

Relativamente aos resultados obtidos, para o prato confeccionado, presentes na Tabela 62, é possível verificar que em todos os parâmetros, com a exceção dos microrganismos a 30°C, os valores se encontram dentro dos limites de quantificação quando comparados com o Valor Guia INSA – Grupo 1. No entanto, esta refeição apresenta valores não satisfatórios no que diz respeito aos microrganismos a 30°C, pelo que assim está não conforme.

Tabela 63 – Resultados para uma refeição pronta a comer

Legislação: Valor Guia INSA – Grupo 1		
Moelas		
Análises efetuadas		Resultados
Microrganismos a 30°C	-1: 2 -2: 0 -3: -4:	Microrganismos presentes <4,0 x 10 ² ufc/g

Relativamente aos resultados obtidos, para o prato confeccionado, presentes na Tabela 63, é possível verificar que em todos os parâmetros os valores se encontram dentro dos limites de quantificação quando comparados com o Valor Guia INSA – Grupo 1. Assim, este prato confeccionado está conforme.

Tabela 64 - Resultados para um produto de pastelaria

Legislação: Requisito do cliente					
Napoleão açúcar - Pastelaria					
Análises efetuadas					Resultados
Bactérias coliformes	Vermelho/violeta -1: 1 -2: 0 -3: -4:				Microrganismos presentes <4,0 x 10 ¹ 1,0 x 10 ¹ ufc/g
	Atípicas -1: - -2: - -3: -4:				
	Nº a confirmar:		Glucose+:		
Bolores e Leveduras	-1: >150	-2: 89	-3:	-4:	8,9 x 10 ⁴ ufc/g
Microrganismos a 30°C	-1: >300	-2: >300	-3: >300	-4: 72	7,2 x 10 ⁵ ufc/g
Estafilococos coagulase +	-1: 0 -2: 0 -3: -4:				< Limite de quantificação ufc/g
	Nº a confirmar:		Coagulase+:		
Salmonella sp.	Tempo de incubação APT 16 a 20h: 19h				Ausente ufc/25g
	4 XLD (negro/transp.):0		4 VB (verm/rosa halo): 0		
	TSI: -				
	Galeria BQ: -				
	Serologia: -				

Relativamente aos resultados obtidos, para o produto de pastelaria, presentes na Tabela 64, é possível verificar que em todos os parâmetros, com a exceção dos microrganismos a 30°C, os valores se encontram dentro dos limites de quantificação quando comparados com os limites definidos pelo cliente. No entanto, esta refeição apresenta valores não satisfatórios no que diz respeito aos microrganismos a 30°C, pelo que assim está não conforme.

Exemplos de resultados de zaragatoas

Depois de serem efetuados os cálculos na sua totalidade, os valores obtidos são colocados na Lista de Trabalho que contém cada amostra e os respectivos parâmetros analisados, como se pode ver pelos exemplos referidos a seguir. A maior parte dos resultados que são colocados na Lista de Trabalho e respectivos cálculos, não foram feitos por mim mas sim pela responsável do departamento de microbiologia,

sendo ela também a submeter os relatórios, num programa informático específico, que são enviados para os clientes.

Tabela 65 – Resultado de uma zaragatoa de superfície

Legislação: Recomendação INSA – Qualidade higiénica de superfícies limpas			
Superfície - Faca			
Análises efetuadas			Resultados
Bactérias coliformes	Vermelho/violeta -1: (0;0) -2: -3: -4: Atípicas -1: - -2: - -3: -4: Nº a confirmar: Glucose+:		< Limite de quantificação ufc/zaragatoa
Escherichia coli	Tempo incubação 18 a 24h: 19h -1: (0;0) -2: -3: -4:		< Limite de quantificação ufc/zaragatoa
Listeria monocytogenes	Período de repouso 1h a 20±2°C: 1h -1: (0;0) -2: -3: -4:		< Limite de quantificação ufc/zaragatoa
	Nº a confirmar: Coagulase+: Gram+: carboN: Hemólise: CAMP:		

Relativamente aos resultados obtidos, para zaragatoa de superfície, presentes na Tabela 65, é possível verificar que, em todos os parâmetros, os valores se encontram inferiores aos limites de quantificação quando comparados com a Recomendação INSA – Qualidade higiénica de superfícies limpas, estando assim conforme.

Tabela 66 – Resultado de uma zaragatoa de manipulador

Legislação: Recomendação INSA – Qualidade higiénica de superfícies limpas			
Mão direita Sra Catarina Lopes			
Análises efetuadas			Resultados
Bactérias coliformes	Vermelho/violeta -1: 0 -2: 0 -3: -4: Atípicas -1: - -2: - -3: -4: Nº a confirmar: Glucose+:		< Limite de quantificação ufc/zaragatoa
Escherichia coli	Tempo incubação 18 a 24h: 19h -1: 0 -2: 0 -3: -4:		< Limite de quantificação ufc/zaragatoa

Listeria monocytogenes	Período de repouso 1h a 20±2°C: 1h				< Limite de quantificação ufc/zaragatoa
	-1: 0	-2: 0	-3:	-4:	
	Nº a confirmar:		Coagulase+:	Gram+:	
	carboN:		Hemólise:	CAMP:	

Relativamente aos resultados obtidos, para zaragatoa de superfície, presentes na Tabela 66, é possível verificar que, em todos os parâmetros, os valores se encontram inferiores aos limites de quantificação quando comparados com a Recomendação INSA – Qualidade higiénica de superfícies limpas, estando assim conforme.

3 – BACTÉRIAS E FUNGOS (EN 13098:2001 (7 e 8))

Para este ensaio são selecionadas as placas com mais de 10 colónias e menos de 300, sendo consideradas como bactérias todas as colónias que cresceram em meio nutritivo com ciclohexamida excluindo as colónias de fungos presentes nas placas. São consideradas como fungos todas as colónias que cresceram em meio MEA com cloranfenicol excluindo as colónias de bactérias presentes nas placas (ver Fig. 34 e 35). Não são precisas provas de confirmação a não ser que seja pedido pelo cliente a identificação de bactérias e fungos.



Fig. 34 – Fungos em meio MEA com cloranfenicol

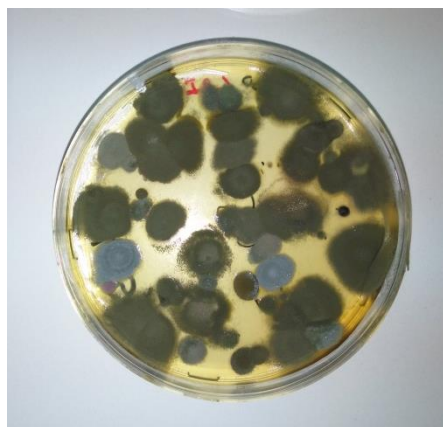


Fig. 35 – Bactérias em meio MEA com cloranfenicol

CÁLCULOS PARA AMOSTRAS DE AR

O resultado é expresso em unidades formadoras de colónias por volume de ar amostrado (ufc/vol. amostrado), sendo que, quando o número de colónias é >300 o resultado é dado como >300 e quando a colheita é efectuada pelo laboratório, é utilizada a tabela de conversão do amostrador para realizar a correcção dos resultados obtidos.

Exemplo de resultados de amostra de ar

Depois de serem efetuados os cálculos na sua totalidade, os valores obtidos são colocados na Lista de Trabalho que contém cada amostra e os respectivos parâmetros analisados, como se pode ver pelos exemplos referidos a seguir. A maior parte dos resultados que são colocados na Lista de Trabalho e respectivos cálculos, não foram feitos por mim mas sim pela responsável do departamento de microbiologia, sendo ela também a submeter os relatórios, num programa informático específico, que são enviados para os clientes.

Tabela 67 – Resultados de uma amostra de ar interior

Legislação: Portaria nº 353-A/2013 – ar interior		
Amostra de ar interior; V=250 L		
Análises efetuadas	Resultados	
	Leitura das placas	Tabela de conversão
Bactérias a 37°C (1)	20	84 ufc/m ³
Bactérias a 37°C (2)	25	104 ufc/m ³
Fungos a 25°C (1)	16	68 ufc/m ³
Fungos a 25°C (2)	23	96 ufc/m ³

Relativamente aos resultados obtidos, para a amostra de ar interior, presentes na Tabela 67, é possível verificar que os valores obtidos pela tabela de conversão estão conformes quando comparados com a Portaria nº 353-A/2013 – ar interior.

CONCLUSÃO

A poluição da água é definida como a sua aplicação inadequada para algum objeto considerado. A qualidade global desta apresenta um ligeiro decréscimo, assim sendo, o tratamento adequado das águas residuais e brutas utilizadas para a produção de água para consumo humano, é fundamental.

Quando os alimentos são preparados de forma incorreta, principalmente nos locais de alimentação coletiva, estes podem por em risco a saúde de um grande número de consumidores. Deste modo, é primordial as boas práticas de higiene desde a matéria-prima até ao produto final.

Aqueles que manipulam os alimentos têm, de igual modo, de respeitar as regras de higiene e segurança alimentares bem como, controlar e assegurar a limpeza das superfícies e utensílios utilizados na sua preparação.

Por isso, para garantir a segurança microbiológica de todas as matrizes mencionadas, é necessário realizar regularmente análises como as que foram apresentadas.

Depois da realização das análises e através dos resultados obtidos e discussão apresentada, é possível observar que qualquer uma das amostras pode apresentar valores conformes ou não-conformes para os parâmetros analisados.

Numa linha mais pessoal, neste estágio curricular aprendi bastante, pondo em prática alguns conhecimentos teóricos obtidos durante a vida académica. Foi extremamente satisfatório ter a oportunidade de realizar este estágio, tanto pelo trabalho que realizei como por toda a equipa que me acompanhou.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ISO 6887-1- Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- ISO 7218:2007- Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations
- ISO 18593- Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs
- ISO 8199:2005- Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture
- ISO 19458- Water quality – Sampling for microbiological analysis
- SMEWW 1020 B (12) e SMEWW 9020 B – Standard Methods for the examination of water & wastewater (21st Edition – 2005)
- ISO 11133 – Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, storage and performance testing of culture media
- NP 2079:1989 – Microbiologia Alimentar: Regras gerais para análise microbiológica
- SMEWW 9020 B (9-4) – Standard methods for the examination of water & wastewater (21st Edition; 2005)
- Folhetos informativos –Teste de catalase; Teste da coagulase; Galeria de identificação; Legionella Latex teste; M42 Microgen Salmonella
- ISO 11731:1998 – Water quality – Detection and enumeration of Legionella
- ISO 21528-2:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method
- ISO 17994:2004 - Water quality -- Criteria for establishing equivalence between microbiological methods
- ISO 6222- Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium
- ISO 9308-1 – Water quality – Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora
- ISO 7899-2 – Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 2: Membrane filtration method
- NP 4343 – Qualidade da água – Pesquisa e quantificação de Estafilococos
- EPA 600 – Membrane filter method for C. perfringens
- Letters in Applied Microbiology 1998, 27, 323-327 – Evaluation of two media for the membrane filtration enumeration of Clostridium perfringens from water
- ISO 6461-2 – Water quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) – Part 2: Method by membrane filtration
- ISO 19250 – Water quality – Detection of Salmonella sp
- ISO 11731-2 – Water quality – Detection and enumeration of Legionella – Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts
- ISO 4833- Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C
- ISO 4832– Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique
- ISO 16649-2– Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β glucuronidase-positive Escherichia coli – Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide

- ISO 21528-2– Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method
- ISO 6888-1– 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 15213 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfitereducing bacteria growing under anaerobic conditions
- ISO 7937– Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique
- ISO 6579– Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp
- ISO 21527-1– 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 7932– Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30°C
- 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 17410- Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms
- EN 13098 (7 e 8) - Workplace atmosphere- Guidelines for measurement of airborne micro-organisms and endotoxin
- ISO 18593 (8 e 9) - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs
- SMEWW 9610 D - Standard Methods for the examination of water & wastewater (21st Edition – 2005)
- SMEWW 9260 M (a) - Standard Methods for the examination of water & wastewater (21st Edition – 2005)
- Ferreira, C.F.W.; Sousa, F.C.J. e Lima, N., 2004, *Microbiologia*, Lidel-Edições Técnicas, Lda, Lisboa, Porto, Coimbra
- Metcal & Eddy, 2002, *Waste water engineering: treatment, reuse*, 4ª edição, McGraw-Hill International Editions, New York
- Gerardi, M.H., Zimmerman, M.C., 2004, *Wastewater pathogens*, John Wiley & sons Inc, New Jersey
- Mendes, B., Santos, O.F., 2004, *Qualidade da água para consumo humano*, Lidel-Edições Técnicas, Lda, Lisboa, Porto, Coimbra
- Percival, S., Embrey, M., Hunter, P., 2004, *Microbiology of waterborne diseases*, Academic Press
- Oliver, J.D., 2005, *The viable but nonculturable state in bacteria*, J. Microbiol 43: 93-100
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2004, *Microbiology*, WCB c Brown publishers, USA
- Slater, J.H., 1985, *Microbial growth dynamics*, *Comprehensive Biotechnology*, vol.1, Pergamon Press
- Araújo, M., 1997, *Segurança alimentar - os perigos para a saúde através dos alimentos*, Meribérica/Liber-Editores, Lda
- Codex Alimentarius Commission, *Recommended International Code of Practice, general principles of food hygiene*
- INSA, 2006, *Guia para control da segurança alimentar em restaurants europeus*

ANEXOS

Anexo 1 – Sala das amostras



Anexo 2 – Sala das amostras – banhos maria



Anexo 3 – Sala das amostras – rampa de filtração



Anexo 4 – Sala das amostras – câmara de fluxo laminar



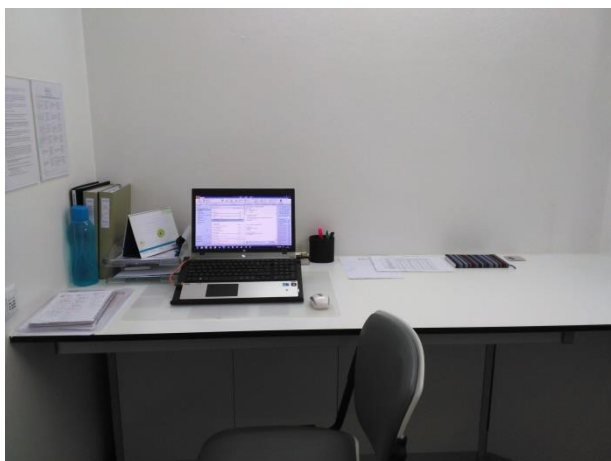
Anexo 5 – Sala das estufas – (1) estufa de 36°C, (2) estufa de 44°C, (3) estufa de 30°C



Anexo 6 – Sala das estufas – (4) estufa de 22°C, (5) estufa de 25°C



Anexo 7 – Sala de apoio – bancada com o computador



Anexo 8 – Sala de apoio – bancada das provas de confirmação: (6) luz UV, (7) microscópio



Anexo 9 – Sala de equipamentos comuns – bancada das balanças



Anexo 10 – Sala de equipamentos comuns – bancada do *Stomacher* bomba dos meios



Anexo 11 – Carrinho de transporte de material e carrinho de material sujo



Anexo 12 – Preparação do tampão ácido pH 2.2 segundo ISO 11731:1998

Em primeiro lugar é preparada uma solução de ácido hidrolórico (HCl) (solução A), sendo adicionados 16,8 mL de ácido clorídrico concentrado para um volume final de 1 L. Depois é adicionado, para um frasco, água destilada e depois o ácido cuidadosamente, de modo a perfazer o volume de 1 L.

Os cálculos necessários para a preparação da solução A são os seguintes:

Solução conc. HCl descrita:	
$d=1.18$	$d=m/V (=) 1.18=100/V (=) V=0.0118 \text{ mL} = 11.8 \text{ L}$
$35.4\% = 35.4 \text{ g soluto} / 100 \text{ g}$	$n=m/M (=) n=35.4/36.46=0.9709 \text{ mol}$
solução	$C=n/V (=) C=0.9709/11.8 (=) C=8.23 \text{ mol/L}$
$V_f=1 \text{ L}$	$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f (=) 8.23 \cdot 17.4 = C_f \cdot 1000 (=) C_f=0.143 \text{ mol/L}$
$V_i=17.4 \text{ mL}$	
$M(\text{HCl})=36.46 \text{ g/mol}$	

Solução conc. HCl disponível:	
$d=1.19$	$d=m/V (=) 1.19=100/V (=) V=0.0119 \text{ mL} = 11.9 \text{ L}$
37%	$n=m/M (=) n=37/36.46=1.015 \text{ mol}$
	$C=n/V (=) C=1.015/11.9 (=) C=8.53 \text{ mol/L}$
$V_f=1 \text{ L}$	$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f (=) 8.53 \cdot V_i = 0.143 \cdot 1000 (=) V_i=16.8 \text{ mL}$

Em segundo lugar é preparada uma solução de cloreto de potássio 0,2 mol/L (KCl) (solução B), sendo dissolvidos 14,9 g de KCl num volume final de 1 L de água destilada (solução B).

Para preparar o tampão ácido, são misturados 39 mL de solução A com 250 mL de solução B. Depois o pH é ajustado para $2,2 \pm 0,2$, utilizando uma solução de hidróxido de potássio 1 mol/L (KOH).

Para preparar a solução de hidróxido de potássio 1 mol/L, são pesadas 5.611g para um volume final de 100 mL de água destilada.

Os cálculos necessários para a preparação da solução KOH - 1 mol/L são os seguintes:

$C_f=1 \text{ mol/L}$	$C=n/V (=) 1 \cdot 0.100=n (=) n=0.100 \text{ mol}$
$V_f=100 \text{ mL}=0.100 \text{ L}$	$n=m/M (=) 0.100 \cdot 56.11=m (=) m=5.611 \text{ g}$
$M(\text{KOH})=56.11 \text{ g/mol}$	

Por fim, o tampão ácido é guardado num recipiente com tampa no escuro e à temperatura ambiente não mais de 1 mês.

Anexo 13 – Preparação da solução salina de Page

Solução descrita (massa g)	Solução mãe 100 x (massa g)
Cloreto de sódio (NaCl) - 0.120 g	Cloreto de sódio (NaCl) - 12.0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0.004 g	Sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) - 0.1953 g
Cloreto de Cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - 0.004 g	Cloreto de Cálcio anidro (CaCl_2) - 0.302 g
Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) - 0.142 g	Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) - 14.2 g
Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) - 0.136 g	Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) - 13.6 g

Os cálculos necessários para a massa de MgSO_4 e CaCl_2 a pesar são os seguintes:

Sulfato de magnésio anidro (MgSO_4)
$m(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 0.004 \text{ g}$
$M(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 24.305 + 32.066 + (4 \cdot 15.999) + (7 \cdot ((2 \cdot 1.008) + 15.999)) = 246.472$
$M(\text{MgSO}_4) = 24.305 + 32.066 + (4 \cdot 15.999) = 120.367$
$M(\text{MgSO}_4 \text{ a pesar}) = (0.004 \cdot 120.367) / 246.472 = 0.001953 \text{ g}$

Cloreto de Cálcio anidro (CaCl_2)
$m(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.004 \text{ g}$
$M(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 40.078 + (2 \cdot 35.453) + (2 \cdot ((2 \cdot 1.008) + 15.999)) = 147.014$
$M(\text{CaCl}_2) = 40.078 + (2 \cdot 35.453) = 110.984$
$M(\text{CaCl}_2 \text{ a pesar}) = (0.004 \cdot 110.984) / 147.014 = 0.00302 \text{ g}$

Onde:

d – densidade
C – concentração (C_i – conc. inicial; C_f – conc. final)
V – volume (V_i – vol. inicial; V_f – vol. final)
M – massa molar
m – massa
n – nº de moles

Em primeiro lugar é preparada uma solução mãe 100 x mais concentrada do que a solução descrita, dissolvendo todos os sólidos referidos em água destilada, prefazendo o volume para 1L. Depois é colocado no agitador até haver dissolução.

A solução vai autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 ± 1 minutos, e é armazenada a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante um máximo de 6 meses (ISO 8199:2005 – 5.2 Diluents). São depois preparadas as soluções de trabalho dissolvendo 10 mL da solução mãe em 1L de água destilada.

Anexo 14 – Tabela de controlo de qualidade dos meios de cultura segundo a ISO 11133

Meio	Norma	Microorganismo alvo	Incubação e Meio de referência		Produtividade		Seletividade		Especificidade	
					estirpe	critério	estirpe	critério	estirpe	critério
Água Peptonada Tamponada (APT)	várias	vários	37°C; 18h	-	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>L. monocyt.</i> <i>Salmonella typh.</i>	turvação ligeira/elevada		não aplicável		não aplicável
Plate Count Agar (PCA)	ISO 4833 ISO 6222	Microorganismos 30°C, 36°C e 22°C	30°C; 72h	TSA	<i>E. coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>	PR ≥ 0.7		não aplicável		não aplicável
CN Pseudomonas Agar (CN)	ISO 16266	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36°C; 48h	TSA	<i>P. aeruginosa</i> (azul-verde)	PR ≥ 0.5		Ø <i>E. coli</i>		não aplicável
Chromogenic Coliform Agar (CCA)	ISO 9308-1	Bactérias coliformes e <i>E. coli</i>	36°C; 24h	TSA	<i>E. coli</i> (azul-violeta) <i>Citrobacter freundii</i> (rosa-vermelho)	PR ≥ 0.7		Ø <i>E. faecalis</i>		+ <i>E. coli</i> (azul-violeta) + <i>C. freundii</i> (rosa-vermelho) + <i>P. aeruginosa</i> (incolor)
Manitol Salt Agar (MSA)	NP 4343:1998	<i>Staphylococcus sp.</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	37°C; 48h	TSA	<i>S. aureus</i> (amarela/branca; coagulase +)	PR ≥ 0.5		Ø <i>E. coli</i>		+ <i>S. aureus</i> (coagulase +) + <i>S. epidermidis</i> (coagulase -)
Slanetz and Bartley (SB) + TTC	ISO 7899-2:2000	<i>Enterococcus faecalis</i>	36°C; 48h	TSA	<i>E. faecalis</i> (vermelho-castanho)	PR ≥ 0.5		Ø <i>E. coli</i>		não aplicável
Bile Esculina Agar (BEA)	ISO 7899-2:2000	<i>Enterococcus faecalis</i>	44°C; 2 h	TSA	<i>E. faecalis</i> (vermelho-castanho)	PR ≥ 0.5		Ø <i>E. coli</i>		não aplicável
m-Cp (MCP)	EPA 600:1996	<i>Clostridium perfringens</i>	44,5°C; 24h	TSA	<i>C. perfringens</i> (amarelas; fosfatase +)	PR ≥ 0.5		Ø <i>E. coli</i>		+ <i>C. perfringens</i> (fosfatase +) + <i>C. bifementians</i> (fosfatase -)
TSC Agar (TSC)	ISO 14189	<i>Clostridium perfringens</i>	37°C; 20h em anaerobiose	TSA	<i>C. perfringens</i> (pretas)	PR ≥ 0.5		não aplicável		+ <i>E. coli</i> (não pretas)
TSC Agar (TSC)	ISO 6461-2	<i>Clostrides sulfitorulitoris</i>	37°C; 20h em anaerobiose	TSA	<i>C. perfringens</i> (pretas)	PR ≥ 0.5		Ø <i>E. coli</i>		não aplicável
TSC Agar (TSC)	ISO 15213	<i>Bactérias sulfitorulitoris</i>	37°C; 20h em anaerobiose	TSA	<i>C. perfringens</i> (pretas)	PR ≥ 0.5		não aplicável		+ <i>E. coli</i> (não pretas)
TSC Agar (TSC)	ISO 7937	<i>Clostridium perfringens</i>	37°C; 20h em anaerobiose	TSA	<i>C. perfringens</i> (pretas)	PR ≥ 0.5		Ø <i>E. coli</i>		não aplicável

Ø – significa inibição total

+ - significa presença

Anexo 15 – Tabela de controlo de qualidade dos meios de cultura segundo a ISO 11133

Meio	Norma	Microorganismo alvo	Incubação e Meio de referência		Produtividade		Seletividade		Especificidade	
					estirpe	critério	estirpe	critério	estirpe	critério
Violet Red Bile Lactose (VRBL)	ISO 4832	Coliformes	30°C; 24h	TSA	<i>E. coli</i> (rosa c/ ou s/ halo)	PR ≥ 0.5	Ø <i>E. faecalis</i>		+ <i>E. coli</i> (rosa c/ ou s/ halo) + <i>P. aeruginosa</i> (incolor a bege)	
Violet Red Bile Glucose (VRBG)	ISO 21528-2	<i>Enterobacteriaceae</i>	37°C; 24h	TSA	<i>E. coli</i> (rosa c/ ou s/ halo)	PR ≥ 0.5	Ø <i>E. faecalis</i>		não aplicável	
TBX	ISO 16649-2	<i>Escherichia coli</i>	44°C; 24h	TSA	<i>E. coli</i> (azul/verde)	PR ≥ 0.5	Ø <i>E. faecalis</i>		+ <i>E. coli</i> (azul/verde) + <i>P. aeruginosa</i> (incolor)	
Baird Parker (BP)	ISO 6888-1	<i>Estafilococos</i> coagulase +	37°C; 48h	TSA	<i>S. aureus</i> (preto-cinza c/ halo)	PR ≥ 0.5	Ø <i>E. coli</i>		+ <i>S. aureus</i> (preto-cinza c/ halo) + <i>S. epidermidis</i> (preto-cinza s/ halo)	
Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC)	ISO 21527-1	<i>Bolores e Leveduras</i>	25°C; 5 dias	TSA	<i>Aspergillus niger</i> (micélio branco-amarelo c/ esporos pretos) <i>S. cerevisiae</i> (rosa)	PR ≥ 0.5	Ø <i>E. coli</i>		não aplicável	
Glucose Agar	ISO 21528-2	<i>Enterobacteriaceae</i>	37°C; 24h	-	<i>E. coli</i> (glucose positiva)	reação positiva	Ø <i>E. faecalis</i>		não aplicável	
XLD	ISO 6579 ISO 19250	<i>Salmonella sp.</i>	37°C; 24h	XLD	<i>Salmonella typhi</i> . (centro negro e zona transparente)	bom crescimento	Ø parcial <i>E. coli</i> (amarelas) Ø <i>E. faecalis</i>		não aplicável	
Brilliant Green Agar (VB)	ISO 6579 ISO 19250	<i>Salmonella sp.</i>	37°C; 24h	VB	<i>Salmonella typhi</i> . (vermelho-rosa claro)	bom crescimento	Ø parcial <i>E. coli</i> (incolor) Ø <i>E. faecalis</i>		não aplicável	
Muller Kauffman Tetrationato (MKTT)	ISO 6579 ISO 19250	<i>Salmonella sp.</i>	37°C; 24h	XLD TSA	<i>Salmonella typhi</i> . <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	bom crescimento (> 10 ufc em XLD)	Ø parcial < 100 ufc <i>E. coli</i> em TSA Ø < 10 ufc <i>E. faecalis</i> em TSA		não aplicável	
Rappaport Vassilidis Soja (RVS)	ISO 6579 ISO 19250	<i>Salmonella sp.</i>	41,5°C; 24h	XLD TSA	<i>Salmonella typhi</i> . <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	bom crescimento (> 10 ufc em XLD)	Ø parcial < 100 ufc <i>E. coli</i> em TSA Ø < 10 ufc <i>E. faecalis</i> em TSA		não aplicável	
Malt Extract Agar (MEA)	EN 13098	Fungos	25°C; 5 d	TSA	<i>Aspergillus niger</i> (micélio claro c/ esporos castanho-preto) <i>S. cerevisiae</i> (branco)	PR ≥ 0.5	Ø <i>E. coli</i>		não aplicável	

Ø — significa inibição total

+ - significa presença

Anexo 16 – Tabela preparação dos meios de cultura segundo a ISO 11133

Meio	esterilização/preparação		pH	suplemento		Período de armazenamento	Observações
	Tipo	T°C/min		nome	massa		
Slants and Bartley (SB) + TTC	Micro-ondas, potência máxima (intervalos de 5 minutos para agitar)		7.2±0.1	-	-	2 semanas (em placa)	-
Bile Esculina Agar (BEA)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.1±0.2	-	-	2 semanas (em placa)	Contém ácido de sódio, substância muito tóxica e mutagênica, evitar contacto e inalação. Antes de utilizar pré-aquecer a 44°C
Água Peptonada Tamponada (APT)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.0±0.2	-	-	3 meses (em frasco e tubos)	-
Plate Count Agar (PCA)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.0±0.2	Ciclohexamida (antes da utilização)	0,010g em 200mL	3 meses (em frasco)	O meio PCA com CH só é aplicável para as amostras de Ar
Baird Parker (BP)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	6.6±0.2	Egg Yolk Tellurite Emulsion	10,5mL em 200mL	6 meses (em frasco)	O meio completo com Egg Yolk Tellurite Emulsion, armazenar durante 24h
Chromogenic Coliform Agar (CCA)	Micro-ondas, potência máxima (intervalos de 5 minutos para agitar)		6.6±0.2	-	-	Se não for usado imediatamente, armazenar em placas durante 1 mês, no	Não ultrapassar os 35 minutos de aquecimento
Violet Red Bile Lactose (VRBL)	Micro-ondas, potência máxima (intervalos de 5 minutos para agitar)		7.4±0.2	-	-	Usar nas 4h seguintes à sua preparação	Ferver até dissolver completamente, sem sobreaquecimento
Violet Red Bile Lactose (VRBG)	Micro-ondas, potência máxima (intervalos de 5 minutos para agitar)		7.4±0.2	-	-	Usar nas 4h seguintes à sua preparação	Ferver até dissolver completamente, sem sobreaquecimento
Dichloran Rose Bengal cloranfenicol (DRBC)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	5.6±0.2	-	-	6 meses (em frasco) 2 semanas (em placa)	-
XLD Agar	Micro-ondas, potência média (intervalos de 5 minutos para agitar)		7.4±0.2	-	-	2 semanas (em placa)	Evitar o aquecimento excessivo, pois pode causar precipitação

Anexo 17 – Tabela preparação dos meios de cultura segundo a ISO 11133

Meio	esterilização/preparação		pH	suplemento		Período de armazenamento	Observações
	Tipo	T°C/tmin		nome	massa		
Brilliant Green Agar (VB)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	6.9±0.2	-	-	2 semanas (em placa)	-
Rappaport Vassiliadis Soy (RVS)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	5.2±0.2	-	-	4 meses (em tubos)	-
Malt Extract Agar (MEA)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	4.5±0.2	Cloranfenicol (antes da utilização)	0,02 g por cada 200 mL	6 meses (em frasco) 30 dias (em placa) - informação do fornecedor	-
TBx	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.2±0.2	-	-	6 meses (em frasco) 2 semanas (em placa)	-
Muller Kauffmann Tetrationato (MKTTn)	Micro-ondas, potência máxima (intervalos de 5 minutos para agitar)		-	Iodo/ Iodeto (antes da utilização)	20 µL por tubo	4 semanas (o meio base)	Após ferver deixar mais 2 minutos Usar imediatamente após a adição d solução de iodine-iodide
m-Cp (MCP)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.6±0.2	m-Cp supplement	1 vial de 6 mL por cada 500 mL	6 meses (em frasco) 2 semanas (em placa)	-
CN Pseudomonas Agar (CN)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.1±0.2	Glicerol	10 mL por cada litro de meio (antes de dissolver o meio)	30 dias (em placa)	-
Manitol Salt Agar (MSA)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.4±0.2	-	-	6 meses (em frasco) 30 dias (em placa) - informação do fornecedor	-
Glucose Agar	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	6.8±0.2	-	-	1 semana (em tubos)	Antes de usar, aquecer em água a ferver durante 15 minutos, depois arrefecer rapidamente até à temperatura de incubação
TSC Agar (TSC)	Autoclave	121,0°C/ 15 minutos	7.6±0.2	D-Cicloserina (quando necessário antes da utilização)	1 vial por cada 200 mL	6 meses (em frasco) 4 semanas (em placa)	-

Anexo 18 – Autoclave



Anexo 19 e 20 – Armazenamento de meios na câmara frigorífica



Anexo 21 – Armazenamento das amostras de água analisadas

