

**Instituto Politécnico de Viseu**

**Escola Superior Agrária**

**CTESP VITICULTURA E ENOLOGIA**

**Sebenta Prática**

**Qualidade e Segurança Alimentar**

**Docente: Paula Correia**

**Viseu 2019**

## **Trabalho Prático N.º 1**

### **Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas (Método das Placas)**

#### **Preparação de amostras para análise microbiológica**

##### ***Método das Placas***

###### *Fundamento*

Este método baseia-se no princípio de que cada microrganismo viável inoculado, em determinadas condições, dará, no final do período de incubação, uma colónia isolada. Obviamente, que este princípio, fundamenta-se no pressuposto de que a suspensão - diluição de microrganismos seja homogénea e que não possua agregados de células.

###### *Natureza*

Devido às suas características, este método determina apenas os microrganismos viáveis, eventualmente, existentes na amostra. E mais, só quantifica, aqueles microrganismos, que tenham capacidade de crescer no meio de cultura e nas condições de incubação utilizadas. Trata-se de um método de contagem de viáveis.

##### ***Preparação de uma Suspensão - Mãe***

###### *Alimentos sólidos*

Destina-se a fixar o processo de suspender e homogeneizar os alimentos sólidos num diluidor, com vista a libertar, numa fase líquida, os microrganismos que aqueles contêm.

###### *Resumo do processo*

A suspensão-mãe para alimentos não líquidos prepara-se colhendo, assepticamente, diversos pedacinhos de diferentes lugares do alimento, até perfazer uma amostra de tamanho adequado e representativa (normalmente 10 g).

Estas 10 g, introduzem-se, num balão ou num saco de plástico esterilizados contendo 90 ml de solução diluidora estéril. Homogeneiza-se muito bem, mecanicamente, mais modernamente, o saco, no Stomacher, durante 1 a 2 minutos, de forma a obter uma suspensão homogénea e capaz de ser pipetada.

A partir desta suspensão-mãe, realizam-se as outras diluições necessárias, procedendo-se do mesmo modo, como o explicado anteriormente, para os alimentos líquidos.

### Alimentos líquidos

Ver secção de “Execução de diluições decimais, alimentos líquidos, ex: leite)

### ***Execução de diluições decimais***

A execução do método das placas pressupõe a realização de diluições quantificadas do alimento ou do substrato que se pretende analisar. Para que isso seja possível, torna-se necessário a preparação de soluções diluidoras, adequadas a cada tipo de alimento.

Qualquer que seja a solução diluidora utilizada, esta deve obedecer aos seguintes requisitos (NP 2079, de 1989):

- Solução estéril destinada à preparação da suspensão - mãe e diluições;
- Possuir uma composição química, que não prejudique o desenvolvimento da flora microbiana a analisar;
- Ser isotónica e possuir um pH neutro.

As soluções diluidoras mais correntemente utilizadas são:

### Solução de Ringer a 1/4

Esta solução desidratada, encontra-se já preparada no comércio, sob a forma de drageias. Esta solução é particularmente indicada, para a execução de diluições de leites, produtos lácteos e outros alimentos.

#### Procedimento

- De acordo com o rótulo, verifica que para a obtenção de 500 ml de solução de Ringer, precisa de dissolver 1 drageia.
- Para a preparação de 500 ml, terá que utilizar meia drageia.
- Meça, com uma proveta, 500 ml de água destilada para o balão adequado e

introduza a drageia.

- Faça a dissolução com agitação, não precisando de aquecer até à ebulição.
- Distribua, com o auxílio de uma pipeta de 10 ml, ou com o distribuidor de meios, rigorosamente, 9 ml para cada um dos tubos de ensaio de 16x160 ml. (isto porque vamos utilizar diluições decimais.) e tape com as tampas metálicas.
- Esterilize, em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

### Peptona - sal

Salvo indicação em contrário, esta solução pode-se aplicar, duma forma geral, a todos os produtos alimentícios.

### Água peptonada tamponada

Esta solução está particularmente indicada para a diluição de alimentos à base de ovos.

### Execução das diluições decimais (alimentos líquidos: ex. leite)

- Identifique os tubos onde vai realizar as diluições.
- Homogeneíze, convenientemente a amostra de leite fornecida, para obter uma perfeita distribuição dos microrganismos.
- Com os cuidados de assepsia que já conhece, pipetar 1 ml da amostra de leite, depois de ter esvaziado e enchido a pipeta 3 a 5 vezes, para o primeiro tubo contendo 9 ml de solução de Ringer esterilizada.
- Homogeneíze cuidadosamente este tubo, utilizando o vortex, de modo que o turbilhão não atinja a bordadura do tubo. Pipetar com nova pipeta esterilizada, 1ml do 1º tubo e transfira-o para o segundo, sem que a ponta da pipeta toque na superfície da solução.
- Proceda, sempre da mesma maneira, até executar todas as diluições pretendidas.

- No presente caso, iremos executar 6 diluições decimais:

$$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} \text{ e } 10^{-6}$$

### ***Preparação do meio de cultura***

O meio de cultura que vamos utilizar, encontra-se já preparado comercialmente, com a denominação de Plate Count Agar da Merck.

#### **Procedimento**

- Prepare 250 ml, do meio de cultura indicado, pesando a quantidade necessária para tal volume, de acordo com as instruções do fabricante.
- Distribua o meio de cultura em volumes de 15 a 20 ml, em cada um dos tubos de ensaio fornecidos.
- Esterilize em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

### ***Expressão dos resultados no método das placas***

Contando o número de colônias, que se formaram nas placas inoculadas, com uma determinada diluição (devem eleger-se as placas que possuam, normalmente, um número de colônias entre 15 e 150, outros números poderão ser recomendados de acordo com normas específicas) e conhecendo o fator da diluição que as originou, bem como a quantidade inoculada, facilmente se determina o número de microrganismos viáveis, existentes por grama (alimento sólido) ou por ml (alimento líquido).

Sabe-se que determinados tipos de bactérias, têm tendência a formar agregados (estafilococos, estreptococos), as contagens resultantes serão mais baixas que o número de células individuais, pois cada um dos agregados formará apenas uma colônia. Por este motivo, é que os resultados obtidos por este método, se devem expressar pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC / ml ou UFC / g).

Assim, pode ser uma unidade formadora de colônias: uma célula, um agregado, um esporo, ou um pedaço de uma hifa, o que torna, esta expressão dos resultados, mais ajustada à natureza do método.

## **Trabalho Prático n.º 2**

### **Determinação de microrganismos através da contagem de colónias obtidas a 30°C**

(Com base na NP 4405 (2002) e na ISO 4833 (2003) – Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms by colony-count technique at 30 °C)

De acordo com o tipo do meio de cultura e as condições de incubação utilizados, poderemos determinar o número de bactérias aeróbias psicrofílas, mesófilas ou termófilas - basta, para isso, utilizar uma temperatura de incubação adequada a cada um daqueles grupos, respetivamente, 6° C, 30° C e 55° C. Estas temperaturas servem apenas de indicação, pois aquando da determinação, de cada um daqueles grupos, devem-se adotar os procedimentos referidos nas NP (Normas Portuguesas) específicas.

Para a determinação de Bolores e Leveduras, deve-se adoptar, por exemplo, meios de cultura que privilegiem a multiplicação destes grupos, em detrimento das bactérias (meios de cultura, como o PDA, mais ácido, com pH de 5,6 ou inferior, ou SABOURAUD, com cloranfenicol ou DRBC – Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol agar). O último meio de cultura referido é o que deve ser utilizado, quando se pretende avaliar leveduras e bolores, tendo por base a utilização da norma ISO 21527 - 1 (2008): Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds by colony-count technique.

### ***Execução das diluições decimais***

- Identifique os tubos onde vai realizar as diluições.
- Prepare a Suspensão-Mãe (conforme descrito no trabalho prático n.º 1)
- Pipetar com nova pipeta esterilizada, 1ml da suspensão mãe e transfira-o para um tubo com 9 ml de solução diluente, sem que a ponta da pipeta toque na superfície da solução.
- Proceda, sempre da mesma maneira, até executar todas as diluições pretendidas.
- No presente caso, iremos executar 6 diluições decimais:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e

10<sup>-6</sup>.

### ***Inoculação (sementeira)***

A técnica de sementeira que vamos utilizar denomina-se: sementeira por incorporação. Esta técnica pressupõe a inoculação de uma determinada quantidade de inóculo (geralmente 1 ml) nas placas de Petri vazias e estéreis.

### ***Procedimento (sementeira por incorporação)***

- Com os cuidados de assepsia, transfira com uma pipeta estéril, 1 ml da amostra da Suspensão mãe, para uma placa de Petri vazia, depois de homogeneizar convenientemente a amostra (as normas referidas recomendam a inoculação de placas em duplicado).

- Com nova pipeta, transfere-se 1 ml da primeira diluição, para nova placa de Petri, não esquecendo de efetuar a sua homogeneização prévia. Proceda da mesma maneira para as várias diluições.

- Incorpore e misture ao inóculo de cada placa, os 15 a 20 ml do meio de cultura, fundido e arrefecido entre 50 °C e 45 °C vertendo de uma vez só no interior da placa.

Execute cinco movimentos de rotação para a direita, cinco para a esquerda, cinco na horizontal e cinco na vertical, sem que o meio de cultura salte para a tampa da placa. Estes movimentos visam a distribuição homogénea dos microrganismos e a sua incorporação no meio de cultura.

- Deixe solidificar as placas em cima da bancada, o que acontece passados alguns poucos minutos.

### ***Incubação***

As placas de Petri semeadas, são colocadas na estufa, à temperatura desejada (no caso, a 30 °C), durante 48 a 72 horas, em posição invertida.

### ***Leitura e interpretação dos resultados***

Após, o período de incubação, procede-se à contagem das colónias formadas. Escolhe-se para a contagem das colónias, a placa ou placas, em duas diluições consecutivas, considerando como primeira diluição a que originar entre 15 e 150 ou 300 colónias. Esta, será a nossa diluição definidora.

### ***Apresentação dos resultados***

#### ***1 – Caso geral***

De acordo com as normas e para diminuir os erros estatísticos, devem-se inocular duas placas por cada diluição efetuada. Nós só inoculámos uma, apenas para economizar material, e porque este trabalho, tem apenas objetivos pedagógicos e didáticos.

a) Seleciona-se a diluição que provocou o aparecimento de uma ou duas placas, contendo entre 15 e 150 ou 300 colónias.

b) Calcula-se os UFC por mililitro ou por grama, fazendo a média ponderada, utilizando a seguinte equação:

$$\text{UFC} = \Sigma C / (n_1 + 0.1n_2) d$$

Em que:

$\Sigma C$  – soma das colónias contadas nas placas das duas diluições;

$n_1$  – número de placas consideradas na primeira diluição (diluição definidora);

$n_2$  - número de placas consideradas na segunda diluição (diluição consecutiva):

$d$  – fator de diluição correspondente à primeira diluição considerada (diluição definidora);

c) Arredondar o resultado obtido apenas a dois algarismos significativos de acordo com as seguintes regras:

c1) Para um número de 3 algarismos, se o último algarismo for inferior a 5, o algarismo precedente não se modifica;



c2) Se o último algarismo for igual ou superior a 5, o algarismo precedente é aumentado de uma unidade;

d) Expressa-se o resultado por um número compreendido entre 1,0 e 9,9, multiplicado por  $10^n$ , sendo n o expoente adequado da potência de 10.

### *Exemplo*

Numa contagem de microrganismos a 30° C, obtiveram-se os seguintes resultados:

- Na primeira diluição considerada ( $10^{-2}$ ) contaram-se 148 colónias
- Na diluição consecutiva ( $10^{-3}$ ) contaram-se 16 colónias
- Utilizou-se uma placa por cada diluição

Então:

$$\text{UFC} = (148 + 16) / (1 + 0.1 \times 1) \times 10^{-2} = 164 / 0,011 = 14909$$

Arredondando o resultado e aplicando as regras anteriores, o número de UFC por ml ou por grama seria apresentado da seguinte forma:  $1,5 \times 10^4$

### *2 – Cálculo de pequenos números*

No caso de todas as placas semeadas não apresentarem colónias, os resultados apresentam-se da seguinte maneira:

- Alimentos líquidos: menos de 1 UFC por ml.
- Outros alimentos (Suspensão - mãe): menos de  $1 \times n$  UFC por grama, sendo n o inverso da diluição da suspensão mãe.

No caso das placas semeadas com a amostra (alimentos líquidos), ou com a Suspensão-Mãe (outros produtos), conterem menos de 15 colónias, o resultado apresenta-se da seguinte maneira:

- Alimentos líquidos: Estima-se o  $\text{UFC/ml} = C$
- Outros alimentos: Estima-se o  $\text{UFC/g} = C/d$  em que:

C – número de colónias contadas

d – fator de diluição da suspensão mãe

No caso de em todas as placas semeadas se encontrar um número de colónias superior a 150 ou 300, o que significa que não foram realizadas as diluições suficientes, deve repetir-se o método, aumentando o número de diluições. No entanto, pode apresentar-se o resultado da seguinte maneira:

- Mais de 300 x n, UFC por ml ou por grama, sendo n o inverso do fator da diluição mais elevada, em que ocorreram as mais de 300 colónias.

### **Trabalho Prático N.º 3**

Determinação das bactérias coliformes, através do método das placas, após incubação a 30° C ou a 37° C, de acordo com a norma ISO 4832 (2006) (Colony – count technique)

#### ***Definição***

Entende-se por bactérias coliformes, a uma determinada temperatura (30 ou 37°C, conforme o acordado), aquelas que formam colónias características, no meio de cultura cristal violeta, vermelho neutro, bile lactose agar (VRBL) e que no teste de confirmação fermentam a lactose, com a consequente produção de gás, no meio de cultura caldo verde brilhante.

#### ***Princípio***

Após a realização de adequadas diluições decimais do alimento a analisar, inoculam-se pela técnica da sementeira por incorporação, duas placas por diluição, usando o meio de cultura seletivo, referido anteriormente, esterilizado e arrefecido em banho - maria a uma temperatura entre os 44 a 47°C.

Depois da colocação do inóculo (1ml), em cada placa de Petri vazia e esterilizada, junta-se cerca de 15 ml do meio de cultura referido, incorporando o inóculo com os movimentos já conhecidos. Após solidificação do meio juntar por cada placa mais cerca de 4 ml do mesmo meio e espalhar pelo mesmo processo.

As placas inoculadas vão incubar, em posição invertida, a 30 ou 37 °C, durante 24 horas.

No final da incubação contam-se as colónias características e se necessário, colónias não características deverão ser confirmadas pela capacidade ou não de fermentação da lactose.

O número de coliformes por mililitro ou por grama, traduzido em UFC/ml ou g, é calculado a partir da contagem das colónias, nas placas selecionadas. As placas selecionadas devem conter entre 10 e 150 colónias características, em duas diluições consecutivas.

São colónias características de bactérias coliformes em VRBL aquelas que apresentam diâmetro com pelo menos 0,5 mm ou maiores, com cor púrpura e vermelha, e algumas

rodeadas de um halo de cor avermelhada. Estas são as colónias características e não precisam de posterior confirmação.

### ***Expressão dos resultados***

O cálculo do número de coliformes em UFC/ml ou g, calcula-se utilizando a formula já referida, mas que se indica mais uma vez e com mais um exemplo de caso geral:

UFC/ml ou g =  $\Sigma C / (n1 + 0.1 n2) d$ , em que:

- $\Sigma C$ : somatório das colónias características nas 4 placas seleccionadas;
- n1: número de placas da 1ª diluição;
- n2: número de placas da 2ª diluição;
- d: fator de diluição correspondente à 1ª diluição.

### ***Exemplo***

Suponha que no final da incubação, obtinha os seguintes resultados:

- 1ª Diluição seleccionada ( $10^{-2}$ ): 83 e 97 colónias características;
- 2ª Diluição seleccionada ( $10^{-3}$ ): 13 e 8 colónias características

Então aplicando a fórmula anterior vem

$$\text{UFC/ml ou g} = 83+97+13+8 / (2+0.1 \times 2) \times 10^{-2}$$

o que dá 9136 ou seja  $9.1 \times 10^3$  UFC/ml ou g.

## **Trabalho Prático N.º 4**

### **Determinação do índice de coliformes**

O índice de coliformes traduz uma pesquisa das bactérias coliformes nos alimentos, não permite uma avaliação quantitativa, mas sim uma avaliação qualitativa daquele grupo.

#### ***Procedimento***

Procede-se do mesmo modo que para a determinação do N.M.P., executando as diluições decimais à extinção. A única diferença reside no número de tubos a inocular a partir de cada diluição, que no caso de se pretender determinar o índice de coliformes, apenas se inocula um tubo por diluição.

Prepare a Suspensão-Mãe e execute corretamente as diluições decimais da amostra, presumindo-se que este número de diluições é suficiente para levar os microrganismos à extinção. Proceda assepticamente e manipule adequadamente.

- Identifique os tubos, com o meio de cultura, de concentração simples onde irá inocular 1 ml de cada uma das;
- Identifique um tubo com o meio de cultura de concentração dupla, onde irá inocular 10 ml de amostra;
- Inocule assepticamente 1 ml de cada uma das diluições em cada um dos tubos, seguindo as diluições sucessivas. Utilize uma pipeta nova para cada diluição inoculada. Ou pode usar, sempre a mesma pipeta, desde que comece a inocular pela diluição mais diluída;
- Antes de cada inoculação homogeneíze adequadamente a diluição (Vortex) e introduza o inóculo no tubo, sem tocar com a ponta da pipeta no meio de cultura.

#### ***Incubação e leituras***

Todos os tubos assim inoculados vão a incubar a 30° C durante 48 horas. Consideram-se positivos todos os tubos em que houve produção de gás nos tubos de Durham e o gás produzido ocupe pelo menos 1/10 da altura do tubo de fermentação.

## Resultados

Após incubação nas mesmas condições (30° C, 48 horas), procede-se à leitura dos resultados que se expressam da seguinte forma:

Seja  $d_1$  o expoente da mais alta diluição decimal positiva

Seja  $d_2$  o expoente da mais baixa diluição decimal negativa

então a pesquisa de bactérias coliformes é positiva em  $10^{d_1}$  g ou ml e negativa em  $10^{d_2}$  g ou ml do produto.

## Determinação de Coliformes fecais

Os coliformes fecais, representados essencialmente pela *E. coli*, apresentam capacidade de crescimento a 44,5° C, fermentando a lactose com produção de gás, em menos de 48 horas, ao contrário dos outros representantes do grupo coliforme.

Assim para a enumeração de *E. coli*, repicar assepticamente uma ansada ou 0,1 ml de crescimento de cada um dos tubos positivos, conseguidos no processo anterior, para novos tubos contendo 10 ml do mesmo meio de cultura esterilizado (concentração simples) e com tubo de Durham.

Colocar os tubos assim inoculados a 44,5° C, durante 48 horas. Ao fim deste tempo os tubos que apresentarem produção de gás e turvação são considerados positivos e presume-se da existência de *Escherichia coli* (Coliformes fecais).

## Confirmação da existência de *Escherichia coli*

Dos tubos positivos obtidos na determinação dos coliformes totais, transferir de cada um, uma ansada ou 0,1 ml de crescimento para tubos contendo o meio de cultura de água peptonada e incubar, também a 44,5 oC durante 48 horas. Após este período e se o resultado for positivo (crescimento com turvação do meio) procede-se à prova do Indol.

A *Escherichia coli* tem a capacidade de produzir indol a partir do triptofano, enquanto que a *Enterobacter aerogenes* não tem esta capacidade. A produção do indol é detetada

pelo reagente de Kovacs. Então, juntam-se algumas gotas deste reagente a cada um dos tubos com crescimento no meio de água peptonada, até cerca de 0,5 cm da superfície do meio. Agitar levemente cada tubo e esperar alguns segundos. O aparecimento de uma cor vermelha viva à superfície dos tubos, significa a presença de *E. coli* e indica que a existência de contaminação fecal.

## Trabalho Prático N.º 5

### Controlo microbiológico de superfícies

As técnicas de impressão, enxaguamento e por contato têm por objetivo o controlo microbiológico de superfícies.

#### *Procedimento*

##### 1. Técnica de enxaguamento

- a) Delimitar a área a analisar (pode ser antes de lavar e depois de lavar), um quadrado com 10 cm de lado ( $100\text{cm}^2$ ) ou para existir maior representatividade, fazer uma amostragem com 4 quadrados com 5 cm de lado (aqui utiliza-se uma zaragatoa diferente para cada quadrado da amostra e juntam-se todas depois no saco stomaker). Pode também ser feito em mãos de operadores ou utensílios. As amostras depois de colhidas devem ser acondicionadas em recipientes isotérmicos, acompanhadas de gelo ou em arcas frigoríficas e devem ser analisadas num prazo máximo de 24 horas.
- b) Retire uma zaragatoa do seu invólucro, não tocando com os dedos diretamente na zaragatoa e depois de humedecida numa solução estéril (solução de Ringer, por exemplo), que deverá levar num tubo de ensaio.
- c) Com a zaragatoa humedecida e fazendo a maior pressão possível, esfregar toda a área de  $25\text{cm}^2$ , rodando a zaragatoa, na direção horizontal, depois numa direção perpendicular à primeira e por fim, segundo a diagonal. Colocar a zaragatoa dentro de um saco de Stomaker estéril, cortando ou quebrando a parte manuseada.
- d) Verter, assepticamente, 100 ml de solução de Ringer, previamente esterilizada, no saco que contém a(s) zaragatoas.
- e) Colocar o saco no Stomaker, e homogeneizar, a uma velocidade normal, durante 2 minutos. Esta será a amostra inicial, não é uma diluição decimal.

---

**Notas:** Em vez de se utilizar o saco do Stomaker pode-se cortar a ponta da zaragatoa para um tubo de ensaio com 10 ml de solução de Ringer e posteriormente homogeneizar no Vortex. Repare que ao colocarmos a amostragem de  $100\text{cm}^2$  em 100 ml, de solução de Ringer, significa que por ml da suspensão irão ficar os mesófilos existentes por  $\text{cm}^2$ .



f) A partir da suspensão obtida, fazer diluições decimais adequadas, e proceder às sementeiras, de acordo com os tipos de microrganismos a avaliar.

g) Colocar a incubar de acordo com as exigências do tipo de microrganismo.

Compare os resultados obtidos com os parâmetros microbiológicos estabelecidos de acordo com Downes & Ito (2001), para mesófilos a 30 °C, para superfícies do sector alimentar, que a seguir se apresenta:

	N.º UFC/ cm <sup>2</sup>
Satisfatório	< 1
Aceitável	2-10
Não satisfatório	> 10

### 2. Técnica de impressão

a) Escolher a área a analisar. No nosso caso será o bordo de duas chávenas de café ou copos.

b) Abrir a placa de Petri, com o meio de cultura já solidificado, junto da chama e colocar o bordo do copo contra o meio. O meio de cultura no nosso caso será o Agar Nutritivo.

c) Pressionar cuidadosamente, fechando de seguida a placa.

d) Fazer o mesmo com o outro copo, mas usando a placa com meio ENDO.

e) A placa com o meio Agar Nutritivo vai a incubar a 30 °C, durante 3 dias para os microrganismos aeróbios totais mesófilos.

f) A placa com o meio ENDO vai a incubar a 30 °C, durante 48h, para os coliformes.

### 3. Técnica de contato

a) Escolher 4 copos ou 4 garrafas para a análise, tapadas com cápsulas (tampas) de caixas de Petri.

b) Liquefazer completamente o Agar nos tubos de ensaio, previamente esterilizados (banho – maria).

c) Escolher dois copos, que estão tapados com as cápsulas de Petri.

d) Verter o Agar Nutritivo do tubo de uma só vez, cerca de 5 ml no copo 1 e o restante no copo 2.

e) No copo 1 procure distribuir o Agar Nutritivo sobre a superfície do fundo do copo, para isso, manter o copo assente sobre o tampo da bancada, descrevendo os movimentos

circulares e retilíneos cobrindo bem toda a superfície do fundo do copo. Deixe em repouso para solidificar.

f) No copo 2, e procurando que este se mantenha tapado com a cápsula de Petri estéril, faça rodar o copo em todos os sentidos debaixo de um jato de água fria, até se formar em toda a superfície interna uma película de Agar. Deve-se ter o cuidado de não tocar na tampa da placa com o Agar. Depois, este copo vai ser incubado verticalmente.

g) Proceder do mesmo modo para os copos 3 e 4, mas agora com meio ENDO fundido.

h) Após a solidificação dos meios de cultura, colocar os copos na estufa a 30 °C, durante 3 dias para a pesquisa de microrganismos mesófilos e 48h para os coliformes (meio ENDO)

### ***Resultados***

1- Nos copos observar e contar as colónias que possam aparecer, quer para o meio ENDO, quer para o meio Agar Nutritivo.

2- Nas placas, observar e contar as colónias para as diferentes diluições.

Nota: Nas placas com meio ENDO, a identificação de colónias de coliformes faz-se através da observação da existência ou não, de uma camada com brilho metálico ou dourada na superfície das colónias. As colónias que apresentarem estas características são colónias de coliformes.

**Critérios microbiológicos que podem e devem ser consultados:**

- Regulamento (CE) nº 1441/2007, de 5 de Dezembro (critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios).
- Portaria nº 1068/95, de 30 de Agosto.
- Portaria nº 56/96, de 22 de Fevereiro.
- INSA – Instituto Nacional de Segurança Alimentar ([www.insa.pt](http://www.insa.pt))
- APHA – American Public Health Association ([www.apha.org](http://www.apha.org)).

**Para um, maior aprofundamento e esclarecimento dos temas abordados, recomenda-se a leitura de:**

- NP - 402 (1966) - Colheita de amostras de leite.
  - NP - 403 (1983) - Leites: Preparação das amostras para análise.
  - NP - 1828 (1982) - Colheita de amostras para análise microbiológica.
  - NP - 1829 (1982) - Preparação da amostra para análise microbiológica.
  - N.P. - 1935 (1986) - Pesquisa de bactérias coliformes em produtos lácticos
  - NP - 1995 (1982) - Regras gerais para contagem de microrganismos a 30 oC
  - NP - 2079 (1989) - Regras gerais para análise microbiológica.
  - N.P. - 3005 (1985) - Preparação de diluições para análise microbiológica
  - ISO: 4832 (2006) (NF) – Méthode horizontale pour dénombrement des coliformes. Méthode par comptage des colonies.
  - ISO 21528 - 2 (2004) – Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Colony-count method.
  - ISO 16649 - 2 (2001) - Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of  $\beta$  – glucuronidase – positive *Escherichia coli*. Colonycount method at 44° C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$  –D- glucuronide.
- Downes, FP and Ito, K (eds)(2001). Compendium of methods for the examination of foods, 4th Ed. American Public Health Association. Washigton, DC.