

Prevalência e crioconservação de *Escherichia coli* β-glucuronidase positiva de origem alimentar

Diana Rita Santos Paixão

Relatório apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professora da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e do Engenheiro Vitor Lopes Amaro, da empresa Aquimisa - Consultores Agro-Industriais, Lda. em Castelo Branco.

Agradecimentos

Muitos foram os que contribuíram para que este trabalho fosse possível. A todos agradeço com sincero sentimento, mas quero deixar uma palavra especial de apreço:

À Professor Dr.^a Cristina Pintado, na qualidade de meu orientador interno, gostaria de manifestar o meu reconhecimento e o meu muito obrigado por toda a paciência e disponibilidade demonstrada, tornando possível a realização deste trabalho.

A todos os membros do laboratório microbiológico da empresa Aquimisa, Lda. pela ajuda e paciência prestada durante o tempo de estágio na empresa.

Um especial agradecimento à Eng^a. Manuela Goulão e D. Helena Martins, do laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pela disponibilidade e ajuda técnica, e pela simpatia sempre demonstrada.

Aos meus pais, pelo incentivo, paciência e esforço monetário feito ao longo de toda a minha vida académica. Sem eles, nada disto teria sido possível.

Aos meus irmãos, irmã e sobrinho pela força e apoio que me transmitiram ao longo dos anos.

Ao João, meu namorado, por toda a paciência, carinho, encorajamento e positivismo sempre demonstrado.

A toda a minha família pela compreensão, força e carinho que me deram ao longo desta caminhada.

Aos meus amigos e colegas pelo apoio e bons momentos sempre proporcionados. Ao companheirismo durante todo o curso e estágio.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, Muito Obrigado!

Prevalência e crioconservação de *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva de origem alimentar

Resumo

Durante o período de estágio no Laboratório de Microbiologia da empresa Aquimisa - Consultores Agro-Industriais, Lda. foi efetuado o acompanhamento da rotina laboratorial ao nível da preparação de meios de cultura e de preparação de material. Foram, no mesmo local, recolhidas 43 placas com colónias características de *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva em diversos alimentos, provenientes de várias zonas geográficas, com o objetivo de obter uma coleção de culturas puras de *Escherichia coli*, através do isolamento, observação, caracterização e crioconservação (trabalho extra realizado no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária).

Foi também feita uma análise crítica ao parâmetro *E. Coli* numa amostra com 1660 alimentos com vários géneros alimentícios: em que 1023 provinham de produtos cárneos, 179 de produtos lácteos, 236 de refeições prontas a comer, 52 de produtos de pesca, 153 de produtos de pastelaria e 17 provinham de ovoprodutos. Os critérios microbiológicos utilizados estão definidos no Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de dezembro de 2007 (que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios) e os Valores Guia do Instituto Nacional De Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

Nesta análise verificou-se que existia uma grande percentagem de produtos cárneos e derivados. Os produtos lácteos apresentaram resultado satisfatório. Quanto aos resultados nos produtos da pesca e ovoprodutos pode-se verificar que 100% das amostras analisadas não são superiores a 10 ufc/g, em que, os ovoprodutos apresentaram resultados satisfatórios. Os produtos de pastelaria, pão e bolos têm resultado satisfatório, nos salgados 58 das amostras analisadas têm resultado satisfatório e 21 das amostras têm resultado não satisfatório. Já nas refeições prontas a consumir todos os tipos de refeições presentes nos grupos 1 e 2 têm resultados satisfatório, nos pratos de carne 125 das amostras têm resultado satisfatório e 28 das amostras têm resultado não satisfatória. Quanto às saladas, vegetais e frutos os resultados indicam-nos que estes são satisfatórios.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Crioconservação, Géneros alimentícios, Critérios microbiológicos.

Prevalence and cryoconservation of β -glucuronidase activity *Escherichia coli* in food products

Abstract

During the stage period in the Microbiology Laboratory of the company *Aquimisa - Consultores Agro-Industriais, Ltd.* was performed routine laboratory monitoring at the level of preparation of culture media and material preparation. Were, in the same place, collected 43 plates with colonies of *Escherichia coli* β -glucuronidase activity in various foods, from different geographical areas, with the objective of obtaining a collection of pure cultures of *Escherichia coli*, through the inoculation, observation, characterization and cryopreservation (extra work carried out in the Microbiology Laboratory/ Escola Superior Agrária de Castelo Branco).

It was also made a critical analysis of the *E. coli* parameter in a sample with 1660 foods with various foodstuffs: 1023 came from meat products, 179 from dairy products, 236 of meals ready to eat, 52 from fishing products, 153 of pastry products and 17 came from egg products. Microbiological criteria used are defined in Regulation (EC) no 1441/2007 of December 5, 2007 (amending Regulation (EC) no 2073/2005 on microbiological criteria applicable to foodstuffs) and Guide values of *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA)*.

In this analysis it was found that there was a large proportion of meat products and derivatives. Dairy products showed satisfactory result. The results in fishery products and egg products can verify that 100% of the samples analysed are not exceeding 10 cfu/g, in which the egg products presented satisfactory results. Pastry products, bread and cakes have satisfactory result in savoury samples analysed, 58 have satisfactory result and 21 samples have unsatisfactory results. Already in meals ready to eat all sorts of meals in groups 1 and 2 have satisfactory results, 125 samples of meat dishes have satisfactory result and 28 samples have unsatisfactory results. In the salads, vegetables and fruits group the results indicate that these are satisfactory.

Keywords: *Escherichia coli*, Cryopreservation, Foodstuffs, Microbiological criteria.

Índice geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abrastact	iv
Índice geral	v
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	vii
Índice de anexos	viii
Lista de abreviaturas	ix
I. Introdução	1
II. Revisão Bibliográfica	3
1. Caracterização da bactéria <i>Escherichia coli</i>	3
2. Metodologias para confirmação de <i>E.coli</i>	4
2.1. Coloração de Gram	4
2.2. Pesquisa do Indol	5
3. Coleções de culturas de microrganismos	5
III. Trabalho realizado no âmbito do estágio	6
1. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da empresa AQUIMISA - Acompanhamento da rotina laboratorial	6
1.1. Meios de cultura	6
2. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da ESACB - Criação de uma coleção de culturas puras de <i>Escherichia coli</i> por Crioconservação	11
2.1. Amostras de Alimentos	11
2.2. Primeira observação e primeira repicagem	12
2.3. Segunda observação e segunda repicagem	14
2.4. Terceira observação e terceira repicagem	16
2.5. Quarta observação	17
2.6. Confirmação bioquímica e morfológica	18
2.6.1. Coloração diferencial - Método de Gram	18
2.6.2. Pesquisa do Indol	19
2.6.3. Resultados	19
2.7. Crioconservação	21
3. Análise crítica de resultados obtido na AQUIMISA para contagem de <i>E.coli</i>	23
3.1. Produtos Cárneos e Derivados	24
3.2. Produtos lácteos e derivados	25
3.3. Produtos da pesca	26
3.4. Ovoprodutos	27
3.5. Alimentos prontos a consumir	28
IV. Considerações finais	30
Referências Bibliográficas	31
Anexos	32

Índice de figuras

Figura 1: Crescimento de colónias características de <i>E. coli</i> em TBX	14
Figura 2: Crescimento de colónias de <i>E.coli</i> em PCA	16
Figura 3: Resultados da pesquisa do Indol (tubos da esquerda - resultado positivo; tubos da direita - resultado negativo)	19
Figura 4: Amostras de <i>E.coli</i> crioconservadas	21
Figura 5: Eppendorf com pellet depositado no fundo	21
Figura 6: Arca a -80°C	23
Figura 7: Crioconservação a -80°C	23
Figura 8: Percentagem de cada grupo de alimentos	24
Figura 9: Produtos cárneos e derivados	25
Figura 10: Produtos lácteos e derivados	26
Figura 11: Produtos da pesca	27
Figura 12: Ovoprodutos	27
Figura 13: Produtos de pastelaria	28
Figura 14: Refeições prontas a comer (RTE)	29

Índice de tabelas

Tabela 1: Caracterização dos alimentos utilizados neste trabalho	12
Tabela 2: Dados referentes à primeira observação e primeira repicagem	13
Tabela 3: Dados referentes à segunda observação e segunda repicagem	14
Tabela 4: Dados referentes à terceira observação e terceira repicagem	16
Tabela 5: Dados referentes à quarta observação	18
Tabela 6: Resultados referentes à coloração de Gram e pesquisa do Indol	20
Tabela 7: Dados referentes à crioconservação	22
Tabela 8: Produtos cárneos e derivados	25
Tabela 9: Produtos lácteos e derivados	26
Tabela 10: Produtos da pesca	27
Tabela 11: Ovoprodutos	27
Tabela 12: Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer no micro-organismo <i>E.coli</i> (INSA)	28
Tabela 13: Produtos de pastelaria	29
Tabela 14: Refeições prontas a comer (RTE)	29

Índice de anexos

Anexo I:	Imagens relativas ao crescimento de <i>E.coli</i> em TBX	32
Anexo II:	Imagens relativas ao crescimento de <i>E.coli</i> em PCA	35
Anexo III:	Imagens relativas aos resultados da pesquisa do Indol	37

Lista de abreviaturas

μ l	Microlitro
APT	<i>Peptone Water (buffered)</i>
BCA	<i>Bacillus Cereus Agar</i>
BEA	<i>Bile Esculin Azide Agar</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BP	<i>Baird Parker Agar</i>
CA	<i>Cetrimide Agar</i>
CSM	Carne separada mecanicamente
EaggEC	Enteroagregativa
EIEC	Enteroinvasiva
EPEC	Enteropatogénica
ESACB	Escola Superior Agrária de Castelo Branco
ETEC	Enterotoxigénica
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
KA	<i>Kanamycin Esculin Azide Agar</i>
LA	<i>CHROMagar Lysteria</i>
MRS	<i>De Man, Rogosa and Sharpe</i>
MSA	<i>Mannitol Salt Agar</i>
MSRV	<i>Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis</i>
NA	<i>Nutrient Agar</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PNCI	Programa Nacional de Controlo de Infecção
RB	<i>Rose Bengal Agar</i>
rpm	Rotações por minuto
RS	<i>Rapid Salmonella</i>
RTE	<i>Ready to eat</i>
SB	<i>Selenite Broth</i>
SL	<i>Slanetz Bartley Agar+TTC</i>
SPS	<i>Clostridium Perfringens Selective Agar</i>
T7	<i>Tertigol 7 Agar</i>
TB	<i>Tryptophan Broth</i>
TBX	<i>Tryptone Bile X-Glucuronide</i>
TCBS	<i>Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose</i>
T-Salt	<i>Tryptone-Salt Agar</i>
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSN	<i>Tryptone Sulfite Neomycin Agar</i>
TTC	<i>Triphenyl Tetrazolium Chloride</i>

VRBL	<i>Violet Red Bile Agar</i>
VRBG	<i>Cristal-Violet Neutral-Red Bile Glucose Agar</i>
VTEC	<i>Verotoxigénica</i>
XLD	<i>Xylose Lysine Deoxycholate agar</i>
WPCA	<i>Yeast Extract Agar</i>