



# **Relatório de Atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco**

Curso Técnico Superior Profissional em Análises Químicas e Biológicas

Carlos Alberto Lopes Antunes

## **Orientadores**

Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Mestre Maria Manuela Martins Francisco Goulão

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Técnico Superior Profissional em Análises Químicas e Biológicas, realizado sob a orientação científica da Mestre Maria Manuela Martins Francisco Goulão, Técnica Superior no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professora adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

**julho de 2018**



## Dedicatória

“Sem esforço, não há vitória” palavras ditas por Benjamin Franklin, mas também pelos meus pais. Sempre que vinha aquela vontade de desistir eram eles que me encorajavam a continuar.

A vida é feita por patamares e em todos eles o meu suporte, para os finalizar, é a minha família.

Dedico tudo o que tenho, de bom ou mau, a eles e este trabalho não é exceção.

Obrigado mãe, obrigado pai e obrigado manos!



## Agradecimentos

O processo de aprendizagem para finalizar este curso foi longo e com obstáculos, mas todo o apoio que me foi prestado merece ser agradecido.

Quero agradecer, de forma especial, a Professora Cristina Pintado pelo acompanhamento prestado nos primeiros 3 semestres, mas acima de tudo pela oportunidade de estagiar no laboratório da escola. Foi muito prestável e bastante profissional, alguém que tinha todo o gosto em partilhar o mesmo espaço de trabalho.

Devo um agradecimento especial à Engenheira Manuela Goulão, pela ajuda, pelos incentivos e pelo companheirismo. Gostei muito de trabalhar com ela e de partilhar ideias e opiniões.

Quero agradecer, também, à Engenheira Lena, pela ajuda em algumas técnicas e pelas informações cedidas.

Obrigado aos colegas que partilharam o mesmo espaço de trabalho e pela ajuda em vários testes: Rita Roque, Ana Rita, Tiago Prata, Catarina Beirão, Joana Domingues, Rita Abreu, Ana Barata, Luís de Matos e Ana Caetano.

Agradeço à Professora Conceição Mesquita pelo acompanhamento feito.

Para outros docentes e técnicos, colegas, amigos e familiares, um grande obrigado!



## **Resumo**

Este relatório tem como objetivo descrever todas as atividades desenvolvidas durante o período de estágio no laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, dar a conhecer todos os passos das técnicas efectuadas e também da importância dos perigos relativos a microbiologia alimentar.

A investigação feita à actinobactéria foi importante para perceber a dificuldade que uma investigação tem, mesmo sabendo que podia não dar em nada. Actinobactéria é uma bactéria filamentosa, que tem a capacidade de inibir bolores e leveduras de forma total, assim como algumas bactérias esporuladas. Contudo, não tem a capacidade de inibir as patogénicas. A análise de águas é de igual forma importante devido aos perigos que aparecem em grande parte delas, a actinobactéria foi um deles.

As restantes atividades desenvolvidas fazem parte do papel de um técnico formado na área.

## **Palavras chave**

Laboratório; Bactéria; Perigos alimentares; Análise de águas.



## **Abstract**

This report aims to describe all the activities developed during the internship period in the Microbiology laboratory of Escola Superior Agrária, to show all the steps of the techniques carried out and also the importance of the hazards related to food microbiology.

The research done about actinobacteria was important to realize how difficult an investigation can be, even knowing that it could end in nothing concrete. Actinobacteria is a filamentous bacteria, which has the ability to inhibit molds and yeasts completely, as well as some sporulated bacteria. Yet, it does not have the capacity to inhibit the pathogen ones.

Water analysis is equally important due to the hazards that appear in most of them, the actinobacteria was one of them.

The remaining activities are part of the role of a trained technician in the area.

## **Keywords**

Laboratory; Bacteria; Food hazards; Water analysis.



## Índice

1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	1
3. Local de estágio.....	2
4. Atividades desenvolvidas .....	3
4.1. Esterilização e inativação de materiais .....	3
4.2. Preparação e distribuição de meios de cultura .....	3
4.3. Repicagem.....	4
4.4. Diluições .....	5
4.5. Sementeira.....	5
4.5.1. Sementeira por incorporação .....	5
4.5.2. Sementeira por espalhamento .....	6
4.6. Esfregaços e colorações .....	6
4.7. Sistemas de identificação .....	7
5. Análises e atividades desenvolvidas.....	7
5.1. Ensaio Interlaboratorial.....	7
5.2. Análise de Águas .....	10
5.2.1. Técnica de Filtração por membrana.....	10
5.2.2. Incubação .....	11
5.2.3. Resultados após 24 horas.....	12
5.2.4. Resultados após 48 horas.....	13
5.2.5. Confirmação de <i>Clostridium perfringens</i> .....	14
5.2.6. Contagem dos mesófilos .....	14
5.2.7. Apresentação de resultados e valores legais.....	15
5.3. Crioconservação .....	16
5.4. Teste de Viabilidade .....	17
5.7. Microorganismos analisados .....	18
6. Trabalho de investigação.....	20
6.1. Teste Antimicrobiano .....	20
6.1.1. Resultados.....	21
6.2. Crescimento .....	22
6.3. Testes complementares .....	23
6.3.1. Colorações.....	23

6.3.2. Catalase .....	24
6.3.3. Crescimento em Agar Sangue e em anaerobiose .....	24
6.3.4. Fermentação de açúcares e produção de H <sub>2</sub> S .....	25
6.3.5. Oxidase.....	26
6.3.6. Redução de nitratos a nitritos.....	26
6.4. Discussões finais.....	26
7. Centro de Biotecnologia das Plantas da Beira Interior .....	27
8. Trabalhos acompanhados.....	27
9. Considerações Finais.....	28
10. Bibliografia .....	29
ANEXOS .....	30

## Índice de figuras

Figura 1 - Distribuição dos meios de cultura. ....	4
Figura 2 - Repicagem com ansa. ....	5
Figura 3 - Coloração específica de esporos. ....	6
Figura 4 - API 20 NE após 48 horas de incubação. ....	7
Figura 5 - Esponja com a lenticula já absorvida. ....	8
Figura 6 - Teste da mobilidade de nitratos para <i>Clostridium perfringens</i> do surto ES0019. ....	8
Figura 7 - Placas de CCA e TSC após 24 horas de incubação. Estão presentes três amostras de águas. ....	12
Figura 8 - Oxidase positiva de uma amostra. ....	13
Figura 9 - Placa de <i>Slanetz e Bartley Agar</i> 48 horas após incubação. ....	13
Figura 10 - Fórmula geral de cálculo de UFC/ml. ....	15
Figura 11 - Processo de crioconservação de bactérias. ....	16
Figura 12 - Colônias da actinobactéria observadas à lupa. ....	20
Figura 13 - Disposição dos campos de teste na placa. ....	20
Figura 14 - Crescimento da actinobactéria em BHI (esquerda) e em CN (direita). ....	22
Figura 15 - Coloração de Gram da actinobactéria. ....	23
Figura 16 - Coloração simples da actinobactéria. ....	23
Figura 17 - Coloração de <i>Ziehl - Neelsen</i> da actinobactéria. ....	23
Figura 18 - Teste do TSI em aerobiose (esquerda) e anaerobiose (direita). ....	25
Figura 19 - Teste de redução dos nitratos. ....	26
Figura 20 - <i>Aspergillus</i> identificado. ....	27

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Microrganismos analisados e seus resultados no Ensaio Interlaboratorial da referência ES0019. ....	9
Tabela 2 - Microrganismos analisados e seus resultados no Ensaio Interlaboratorial da referência ES0020. ....	9
Tabela 3 - Meios de cultura e condições iniciais de incubação usados na contagem de <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , enterococos e coliformes. ....	11
Tabela 4 - Resultados após 24 horas e seguintes procedimentos. ....	12
Tabela 5 - Resultados após 48 horas e seguintes procedimentos. ....	13
Tabela 6 - Temperaturas e tempos de incubação dos mesófilos. ....	15
Tabela 7 - Valores permitidos por lei das quantidades dos microorganismos presentes na água. Valor paramétrico corresponde ao máximo admitido e o VMR corresponde ao valor que não é desejável ultrapassar. ....	16
Tabela 8 - Microrganismos analisados ao longo do período de estágio. ....	18
Tabela 9 - Resultados retirados após 24 e 48 horas de incubação. ....	21
Tabela 10 - Diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição. ....	22
Tabela 11 - Descrição das diferentes reações e fermentação para os açúcares do meio. ....	25