



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

**Relatório de Atividade Profissional  
Monitorização e controlo microbiológico das águas de  
consumo humano de captações próprias  
da Universidade da Beira Interior**

**João José Popo Lobo Antunes Pereira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Industrial**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Albertina Maria Mendes Marques Bento Amaro

Covilhã, junho de 2016



# Agradecimentos

Agradeço a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Doutora Albertina Maria Mendes Marques Bento Amaro pela oportunidade que me deu de poder realizar e por todo o apoio prestado durante a elaboração deste trabalho, pela disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

A todas as pessoas com que me cruzei profissionalmente e que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e profissional.

Quero agradecer aos meus pais e ao meu irmão por terem acreditado sempre nas minhas capacidades e no meu esforço.

À minha mulher, Cláudia, pelo apoio contínuo, incentivando-me sempre a fazer mais e melhor.

Finalmente, de um modo muito especial, quero agradecer às minhas filhas, Filipa e Mariana pelo carinho e alegrias com que diariamente me contagiam.



# Prefácio

De acordo com a recomendação do Conselho de Reitores das Universidades Portuguesas (CRUP) de 8 de janeiro de 2011, os licenciados que tenham terminado as suas licenciaturas ao abrigo do sistema de graus anteriores ao Processo de Bolonha e que tenham mais do que 5 anos de experiência profissional relevante, poderão inscrever-se num ciclo de estudos de mestrado da especialidade, solicitando a creditação da componente letiva previamente adquirida no âmbito da respetiva licenciatura, acrescida da apresentação de uma dissertação ou em alternativa de um relatório detalhado sobre a atividade profissional desenvolvida, ambos objeto de defesa em prova pública, de acordo com a legislação aplicável (Comunicação do CRUP, 2011).

Neste âmbito e tendo em conta estes requisitos e com o objetivo de alcançar o grau de Mestre, o signatário irá apresentar à Universidade da Beira Interior e à Comissão de Curso do 2.º ciclo de Química Industrial, para apreciação, a sua formação académica e experiência profissional em detalhe. Pretende-se ainda demonstrar que as licenciaturas em Engenharia Alimentar e Engenharia Biológica e Alimentar pela Escola Superior Agrária de Coimbra e Escola Superior Agrária de Castelo Branco, respetivamente e a formação e experiência adquiridas em diversas áreas, se enquadrem nos objetivos gerais e nas competências necessárias pela Comissão de Curso do 2.º ciclo de Química Industrial.

O percurso profissional evidencia um desenvolvimento dos conhecimentos adquiridos com as licenciaturas em Engenharia Alimentar e Engenharia Biológica e Alimentar e um alargamento de competências e experiência na área da microbiologia em geral e da microbiologia alimentar em particular.

Descreve-se ainda, com algum pormenor, um programa de controlo analítico baseado num sistema de vigilância da água destinada ao consumo humano, captada e distribuída pelo sistema de abastecimento da Universidade da Beira Interior, tendo como objetivo garantir a qualidade da água para consumo humano em termos bacteriológicos.



## Resumo

O abastecimento público de água é uma preocupação constante e crescente em termos de saúde pública, devido à escassez e deterioração da qualidade dos recursos hídricos. A água não tratada pode ser imprópria para consumo humano, pode conter microrganismos indesejáveis e patogênicos ou produtos químicos, capazes de causar doenças, de veiculação hídrica, que são causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidos pela rota fecal-oral (Amaral LA *et al*, 2003). Os coliformes são microrganismos indicadores de contaminação fecal, sendo indicadores importantes da qualidade e potabilidade da água.

Este trabalho teve como finalidade a avaliação global da qualidade microbiológica da água distribuída na Universidade da Beira Interior a partir de captações próprias de água de origem subterrânea, através de amostragens mensais efetuadas entre o ano 2014 e 2015, dando cumprimento à legislação em vigor, nomeadamente o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto e também garantir a manutenção de um controlo operacional que permita detetar possíveis anomalias na qualidade da água, ocasionais ou de carácter sistemático, de modo a permitir que sejam postas em prática medidas preventivas e/ou corretivas.

Dado que se trata de uma Instituição de Ensino, em que o uso da água é extremamente diversificado, é de extrema importância avaliar a potabilidade da água de consumo, pois ela é utilizada para hidratação, em todas as atividades de higiene e na preparação de alimentos.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior. Os métodos de análise foram efetuados de acordo com o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto para controlo da qualidade da água de consumo humano seguindo normas internacionais para os seguintes parâmetros: pesquisa e quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*; pesquisa e quantificação de Enterococos intestinais; pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens* e contagem de microrganismos a 22 °C e 36 °C.

## Palavras-chave

Água da torneira, microbiologia, análises de rotina, legislação.



# Abstract

The public water supply is of great and growing concern in terms of public health, due to the deteriorating quality of water resources which are becoming scarce. Untreated water may be unfit for human consumption, because it may contain undesirable microorganisms or chemicals capable of causing waterborne disease. They are mainly caused by pathogenic microorganisms of enteric origin, animal or human, transmitted by fecal-oral route (Amaral, LA et al., 2003). Coliforms are indicator bacteria of fecal contamination, that are important indicators of the quality and potability of water.

This work aimed to the overall assessment of the microbiological quality of water distributed in the University of Beira Interior from its own wells. Analyses were performed in samples collected monthly, between 2014 and 2015, in compliance with the legislation, namely Decree 306/2007 (27 August). Also it was intended to ensure the maintenance of an effective monitoring that allows detecting possible anomalies in the water quality, occasional or systematic, in order to allow preventive and/or corrective measures to be taken. Since it is an educational institution, where water use is extremely diverse, it is very important to evaluate the potability of the consumption water, since it is used for hydration in all hygiene activities and food preparation.

Microbiological analyzes were performed at the Microbiology Laboratory of the Department of Chemistry at the University of Beira Interior. The analytical methods were in accordance with Decree 306/2007 (27 August) for control of drinking water quality, according to international standards for the following parameters: detection and quantification of total coliforms and *Escherichia coli*; search and quantification of intestinal enterococci; search and quantification of *Clostridium perfringens* and total microorganism counts at 22 and 36 °C.

## Keywords

Drinking water, microbiology, routine analysis, legislation.



# Índice

<b>Capítulo 1 - Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Contextualização	1
1.2. Objetivo e Âmbito	4
1.3. Estrutura do trabalho	6
<b>Capítulo 2 - Percurso Académico e Profissional</b>	<b>7</b>
2.1. Formação Académica	7
2.2. Percurso Profissional	7
2.3. Outras Atividades: Formador	9
2.4. Formação Profissional e Estágios	10
2.4.1. Cursos de Formação	10
2.4.2. Participação em Seminários e Congressos	11
2.4.3. Estágios	12
<b>Capítulo 3 - Revisão Bibliográfica</b>	<b>13</b>
3.1. A Água	13
3.2. Água tratada	13
3.3. Qualidade microbiológica da água para consumo humano	17
3.3.1. Bactérias coliformes	18
3.3.2. <i>Escherichia coli</i>	18
3.3.3. Número de colónias a 22 °C e 36 °C	19
3.3.4. <i>Clostridium perfringens</i>	20
3.3.5. Enterococos intestinais	21
3.4. Qualidade da água para consumo humano - Enquadramento legal	21
3.5. Nutrição microbiana	23
3.5.1. Crescimento de culturas bacterianas	24
3.5.2. Expressão matemática do crescimento bacteriano	26
3.5.3. Efeitos ambientais sobre o crescimento microbiano	29
3.5.3.1. Fatores físicos	30
3.5.3.2. Fatores químicos	35
3.6. Meios de cultura	37
3.7. Célula Bacteriana	39
3.7.1. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	42
3.7.1.1. Coloração diferencial de Gram	42

<b>Capítulo 4 - Fundamentos práticos</b>	45
4.1. Amostragem	45
4.2. Processo de colheita da amostra de água para análise microbiológica	45
4.3. Meios de cultura	48
4.4. Provas Bioquímicas	49
4.5. Métodos de análise microbiológica da água	53
4.5.1. Método de filtração por membrana -. Pesquisa e quantificação	55
4.5.2. Método por incorporação	56
4.6. Métodos analíticos de referência	57
4.6.1. Enumeração de microrganismos viáveis - número de colónias a 22 °C e 36 °C - ISO 6222:1999	57
4.6.2. Método para pesquisa e quantificação de Enterococos - ISO 7899-2:2000	58
4.6.3. Método para contagem e isolamento de <i>Clostridium perfringens</i> - Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 para água de consumo humano pelo método de filtração de membrana	60
4.6.4. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes - SM 9222B	62
4.6.5. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes Fecais ( <i>Escherichia coli</i> ) - SM 9222D	64
<b>5. Caso Prático</b>	69
5.1. Introdução	69
5.2. Enumeração de microrganismos viáveis - número de colónias a 22 °C e 36 °C - ISO 6222:1999	69
5.3. Método para pesquisa e quantificação de <i>Enterococcus</i> - ISO 7899-2:2000	70
5.4. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes - SM 9222B	71
5.5. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes Fecais ( <i>Escherichia coli</i> ) - SM 9222D	72
5.6. Método para contagem e isolamento de <i>Clostridium perfringens</i> - Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 para águas de consumo humano pelo método de filtração de membrana	72
<b>6. Conclusões e perspectivas futuras</b>	75
Referências Bibliográficas	77
<b>Anexo A</b>	83
Anexo A1 - Certificados de Habilitações	85
Anexo A2 - Certificados de Trabalho	89

Anexo A3 - Comprovativos da atividade como Formador	91
Anexo A4 - Certificados de Formação	95
Anexo A5 - Comprovativos de Participação em Seminários e Congressos	109
<b>Anexo B</b>	<b>119</b>
Anexo B1 - Enumeração de microrganismos viáveis - número de colónias a 22 °C e 36 °C - ISO 6222:1999	120
Anexo B2 - Método para pesquisa e quantificação de <i>Enterococcus</i> - ISO 7899-2:2000	121
Anexo B3 - Método para contagem e isolamento de <i>Clostridium perfringens</i> - Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 para água de consumo humano pelo método de filtração de membrana	123
Anexo B4 - Método para pesquisa e quantificação de Bactérias coliformes - SM 9222B	125
Anexo B5 - Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes Fecais ( <i>Escherichia coli</i> ) - SM 9222D	127
<b>Anexo C</b>	<b>129</b>
Anexo C1 - Resultados das amostragens efetuadas no ano de 2014 e 2015	130



# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Evolução das Doenças de Declaração Obrigatória de possível origem hídrica no período de 2010 a 2014	2
<b>Figura 2</b> - Evolução do indicador água segura entre 1993 e 2014	3
<b>Figura 3</b> - Vista aérea da Faculdade de Ciências Sociais e Humanas (FCSH) e localização da ETA 1	4
<b>Figura 4</b> - Vista aérea da Residência Pedro Álvares Cabral (PAC) e localização da ETA 2	4
<b>Figura 5</b> - Vista aérea da Reitoria, SASUBI, Residência I, Residência II e localização da ETA 3	5
<b>Figura 6</b> - Vista aérea da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) e localização da ETA 4	5
<b>Figura 7</b> - Redução do número de casos fatais de febre tifóide nos Estados Unidos de 1900 a 1990 após implementação de sistemas de desinfecção pelo uso de derivados de cloro	14
<b>Figura 8</b> - Aspeto geral do sistema de desinfecção de água numa ETA da UBI (a) cuba da solução de hipoclorito de sódio (b) doseador hidráulico de cloro	16
<b>Figura 9</b> - Diferenciação do grupo coliforme	19
<b>Figura 10</b> - Curva de crescimento típica de uma cultura bacteriana	24
<b>Figura 11</b> - Curva de crescimento exponencial logicamente e aritmeticamente	26
<b>Figura 12</b> - Determinação do tempo de geração	28
<b>Figura 13</b> - Velocidade de crescimento característica de microrganismos em função da temperatura	31
<b>Figura 14</b> - Efeito da concentração de NaCl no crescimento de microrganismos com diferentes tolerâncias ou necessidades de sal	34
<b>Figura 15</b> - Estrutura de uma célula bacteriana	40
<b>Figura 16</b> - Comparação das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	40
<b>Figura 17</b> - Formas morfológicas bacterianas	41
<b>Figura 18</b> - Procedimento geral e respetiva morfologia da coloração diferencial de Gram	42
<b>Figura 19</b> - Procedimento para colheita de uma amostra de água para consumo humano	47
<b>Figura 20</b> - Procedimento para a determinação da oxidase usando o método de tira e escala colorimétrica	50
<b>Figura 21</b> - Mecanismo de reação do reagente de Kovacs	52

<b>Figura 22</b> - Sementeira de amostras de águas de abastecimento	54
<b>Figura 23</b> - Sequência operativa da técnica de filtração por membrana	55
<b>Figura 24</b> - Procedimento do método de incorporação	57
<b>Figura 25</b> - Colónias típicas em meio de cultura <i>Slanetz and Bartley</i> Agar, após incubação a 36 °C ± 2 °C durante 44 h ± 4 h	59
<b>Figura 26</b> - Colónias do género <i>Enterococcus</i> em meio Bilis Esculina Azida Agar com reação positiva para a esculina a 44 °C ± 0,5 °C durante 24 horas	60
<b>Figura 27</b> - Colónias características de <i>Clostridium perfringens</i> em m-CP Agar	61
<b>Figura 28</b> - Viragem de cor das colónias de <i>Clostridium perfringens</i> em m-CP Agar após exposição a vapores de hidróxido de amónio	61
<b>Figura 29</b> - Colónias características de Coliformes totais no meio de cultura m-ENDO Agar LES	63
<b>Figura 30</b> - Teste da Oxidase: reação positiva e negativa em teste de tira	64
<b>Figura 31</b> - Colónias características de coliformes fecais ( <i>E. coli</i> ) em meio m-FC Agar	65
<b>Figura 32</b> - Prova de indol de Kovacs: da esquerda para a direita - branco, negativo e positivo	66
<b>Figura 33</b> - Colónias de microrganismos em meio nutritivo a 22 °C na amostra de água sem tratamento	69
<b>Figura 34</b> - Número de amostragens efetuadas para cada ponto entre os anos de 2014 e 2015	73

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Relação das quatro ETA com as respetivas zonas de abastecimento e população servida	5
<b>Tabela 2</b> - Lista de parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para águas de consumo humano, Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto	22
<b>Tabela 3</b> - Exemplo de crescimento exponencial	27
<b>Tabela 4</b> - Tempos de geração de alguns microrganismos	29
<b>Tabela 5</b> - Valores mínimos de atividade de água ( $a_w$ ) para multiplicação de alguns microrganismos	33
<b>Tabela 6</b> - Classificação dos meios de cultura	39
<b>Tabela 7</b> - Meios de cultura utilizados para identificação e enumeração dos microrganismos	48
<b>Tabela 8</b> - Controlo de qualidade para o teste da Oxidase	50
<b>Tabela 9</b> - Controlo de qualidade utilizado para a prova de indol de Kovacs	52
<b>Tabela 10</b> - Método de ensaio para a determinação dos parâmetros microbiológicos por filtração em membrana	54
<b>Tabela 11</b> - Método de ensaio para a determinação dos parâmetros microbiológicos por incorporação	57
<b>Tabela 12</b> - Características das colónias após crescimento no meio de cultura <i>Slanetz and Bartley Agar</i>	59
<b>Tabela 13</b> - Características das colónias em m-CP Agar	62
<b>Tabela 14</b> - Características das colónias após crescimento em m-CP Agar	62
<b>Tabela 15</b> - Características das colónias após crescimento em m-ENDO Agar LES	63
<b>Tabela 16</b> - Características das colónias após crescimento no meio de cultura m-FC Agar	65
<b>Tabela 17</b> - Controlo de qualidade para o teste da Oxidase e a prova de indol de Kovacs	67
<b>Tabela 18</b> - Número de colónias a 22 °C e a 36 °C na amostra sem tratamento e com tratamento	70
<b>Tabela 19</b> - Pesquisa e quantificação de Enterococos na amostra sem tratamento e com tratamento	70
<b>Tabela 20</b> - Pesquisa e quantificação de Bactérias coliformes na amostra sem tratamento e com tratamento	71
<b>Tabela 21</b> - Pesquisa e quantificação de Bactérias coliformes fecais ( <i>E. coli</i> ) na amostra sem tratamento e com tratamento	72
<b>Tabela 22</b> - Pesquisa e quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> na amostra sem tratamento e com tratamento	73

<b>Tabela 23</b> - Qualidade da água nos diversos pontos de amostragem para os parâmetros bacteriológicos exigidos legalmente	130
<b>Tabela 24</b> - Resultados relativos à qualidade da água nos diversos pontos de amostragem para os parâmetros bacteriológicos exigidos legalmente (cont.)	131
<b>Tabela 25</b> - Resultados relativos à qualidade da água nos diversos pontos de amostragem para os parâmetros bacteriológicos exigidos legalmente (cont.)	132

## Lista de Acrónimos

APDA	Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas
APEMETA	Associação Portuguesa de Empresas de Tecnologias Ambientais
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
ARS	Administração Regional de Saúde, I.P.
BEAA	Bílis Esculina Azida Agar
CE	Comunidade Europeia
CFIUTE	Centro de Formação Interação UBI Tecido Empresarial
CITEVE	Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal
DDO	Doenças de Declaração Obrigatória
DGS	Direção-Geral de Saúde
DMAB	<i>para</i> -Dimethylaminobenzaldehyde
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DSIA	Direção de Serviços de Informação e Análise
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPA	United States Environmental Protection Agency
ETA	Estação de Tratamento de Água
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, I.P.
EUA	Estados Unidos da América

FCS	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior
FCSH	Faculdade de Ciências Sociais e Humanas da Universidade da Beira Interior
FIPA	Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares
IRAR	Instituto Regulador de Águas e Resíduos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
m-CP	<i>Membrane Clostridium perfringens</i>
m-FC	<i>Membrane Faecal coliform</i>
mg·L <sup>-1</sup>	Miligrama(s) por litro
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NP	Norma Portuguesa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAC	Residência Pedro Álvares Cabral (Universidade da Beira Interior)
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniónico
PSA	Plano de Segurança da Água
RASARP	Relatório Anual dos Serviços de Águas e Resíduos em Portugal
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
SASUBI	Serviços de Ação Social da Universidade da Beira Interior

SM	<i>Standard Methods</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TTC	<i>Triphenyltetrazolium Chloride</i>
UBI	Universidade da Beira Interior
UFC	Unidade Formadora de Colónias
VP	Valor Paramétrico



# Capítulo 1

## 1. Introdução

### 1.1. Contextualização

A água tem influência direta sobre a saúde, a qualidade de vida e o desenvolvimento do ser humano. A água doce existente já não pode ser considerada um recurso renovável, em função da degradação da sua qualidade, pela disposição de efluentes, resíduos domésticos e industriais sem tratamento ou com tratamento inadequado.

A água é um recurso natural e finito, com importante valor económico e social sendo essencial à existência do Homem e do Meio Ambiente. Apesar da grande quantidade de água do planeta Terra, somente 3% é água doce e menos de 1% está disponível para consumo humano (rios, lagos, atmosfera). O ser humano utiliza água doce no estado líquido, que vai buscar à água superficial, em rios ou em lagos, ou à água subterrânea, acumulada em lençóis de água.

Segundo Sousa *et al.*, (2015) a água potável pode ser dividida em três grupos distintos: águas subterrâneas, águas superficiais e as restantes formas de água adequada para consumo humano. Tanto as águas subterrâneas como as águas superficiais, são originárias do subsolo, sendo as primeiras caracterizadas pelas suas características físico-químicas estáveis e altas concentrações de sais minerais e oligoelementos que resultam da interação com as rochas subterrâneas existentes. Estas características podem trazer benefícios para a saúde.

A água subterrânea vem assumindo um papel relevante como fonte de abastecimento, pois diminui os custos com a captação, adução e tratamento. Estas águas, pelo facto de estarem em estreita ligação com o material geológico envolvente, contendo minerais solúveis, apresentam um conteúdo natural em sais dissolvidos superior ao das águas superficiais. As características químicas destas águas resultam, assim, das propriedades das formações geológicas e da forma como se processa a circulação de água no meio subterrâneo (Ferreira *et al*, 2009).

As características do meio subterrâneo mais importantes para a definição da qualidade das águas subterrâneas são:

- físicas: a textura, a porosidade e a condutividade hidráulica; este conjunto de características determina o regime de recarga, o tipo de escoamento subterrâneo e a superfície de contacto entre a água e o meio subterrâneo envolvente;
- químicas e biológicas: a composição mineralógica da matriz sólida, o pH, o potencial de oxidação/redução, a capacidade de troca catiónica, o conteúdo em matéria orgânica e a concentração em microrganismos (Ferreira *et al*, 2009).

A captação das águas subterrâneas consiste, uma vez conhecidas as condições hidrológicas de um aquífero, na execução das obras que conduzem à melhor recolha das referidas águas em quantidade e qualidade.

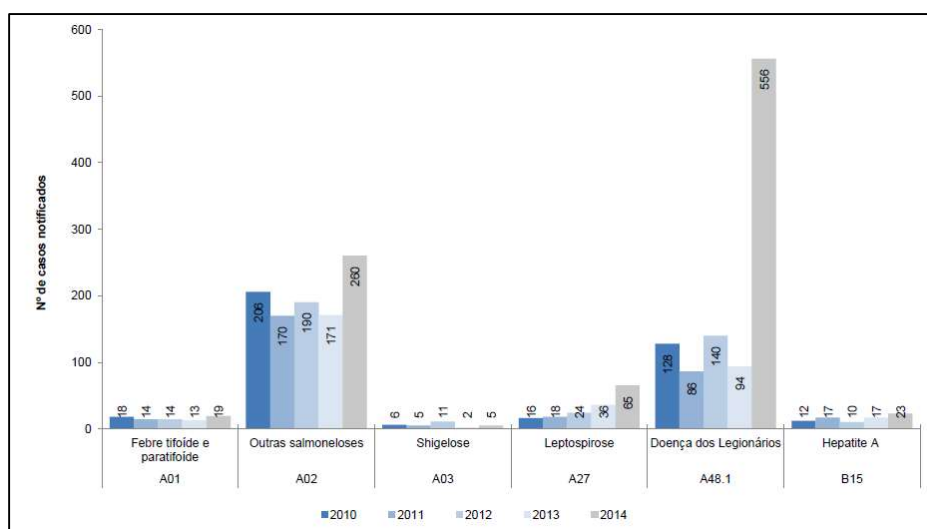
A opção por captações subterrâneas apresenta algumas vantagens. A primeira consiste na redução de custos de tratamentos, restringindo-se apenas a processos de desinfecção e correção de pH. No caso particular da UBI apenas se efetua o processo de desinfecção da água bruta. Uma segunda vantagem associada à utilização de recursos subterrâneos reside, na maioria dos casos, na existência de uma adutora de água bruta, pois a unidade de desinfecção pode ser instalada próxima da origem (Dutra da Silva, L.S.P., 2010).

A água pode ser contaminada por diferentes formas, tais como produtos químicos que ocorrem naturalmente e minerais, infraestruturas deficientes e más práticas agrícolas. O maior risco microbiológico associado à água é a contaminação fecal que pode ser uma fonte de bactérias patogénicas, vírus ou parasitas (Sousa *et al*, 2015).

A água é um importante veículo de agentes patogénicos causadores de diversas doenças no ser humano pelo que a sua qualidade microbiológica é determinada e aferida através da análise a microrganismos indicadores de contaminação fecal que residem no intestino humano ou animal. O grupo de bactérias indicadoras de poluição fecal pertence ao grupo dos coliformes: *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e enterococos fecais (Nogueira *et al*, 2008).

Estudos epidemiológicos demonstram que a ingestão de águas que contenham elevadas concentrações de coliformes aumenta o risco de contrair doenças gastrointestinais como cólera, diarreia, amebíase, salmonelose e outras (Ashbolt N.J., 2004, citado por Scapin D. *et al*, 2012).

Na **Figura 1** apresenta-se a evolução das Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) de possível origem hídrica nos últimos cinco anos em Portugal continental (Fonte: RASARP, 2015).

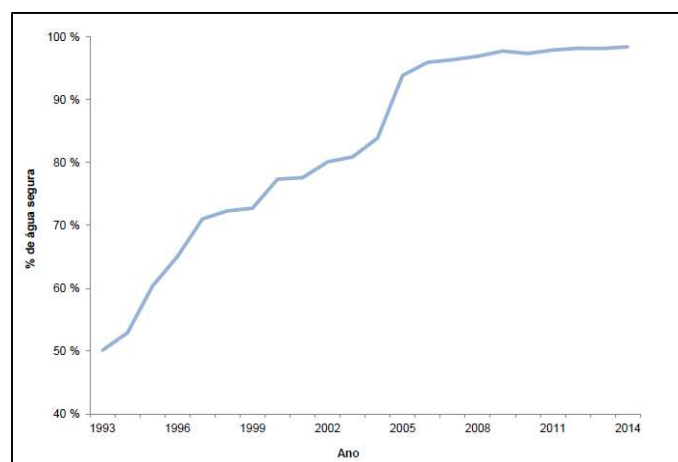


**Figura 1** - Evolução das Doenças de Declaração Obrigatória de possível origem hídrica no período de 2010 a 2014 (Fonte: DGS/DSIA-Base de dados das DDO, citado por RASARP, 2015)

A água utilizada para o consumo humano não deve causar danos à saúde pública, deve ser agradável ao paladar, à vista dos consumidores e, não causar deterioração ou destruição das diferentes partes do sistema de abastecimento; estes aspetos físicos e sensoriais estão ligados aos parâmetros organoléticos, microbiológicos, físico-químicos e tóxicos, os quais definem se uma determinada água é adequada para o consumo humano.

É neste sentido que a desinfecção da água com cloro assume uma importância inquestionável na água de consumo (Chiller, T.M. *et al*, 2006). Tal acontece por vários motivos, em primeiro lugar, para inativar as bactérias e, mais importante, para garantir que se mantém um teor residual de desinfetante de modo a eliminar qualquer bactéria introduzida durante a fase de armazenamento ou na distribuição (OMS, 2013). Uma concentração de cloro residual entre 0,2 e 0,5 mg/L, para um tempo de contacto com a água de 30 minutos, é geralmente suficiente para controlar a densidade de microrganismos e garantir uma desinfecção satisfatória. Segundo a Environmental Protection Agency (EPA), o teor residual de  $Cl_2$  não deve ultrapassar o valor de 0,8 mg/L, pois uma exposição a valores superiores tem efeitos potenciais na saúde pública, podendo eventualmente causar anemia e efeitos no sistema nervoso em crianças e adolescentes (Recomendação IRAR n.º05/2007).

Desde 1993 que o setor do abastecimento público em Portugal tem sofrido uma evolução significativa e de forma contínua, com especial destaque nos níveis de qualidade da água fornecida aos consumidores. O fornecimento, em segurança, de água para consumo humano pressupõe uma ação de controlo concertada e estruturada ao longo de todo o sistema de abastecimento, desde a origem da água bruta até à torneira do consumidor (Vieira, J.M.P., Morais, C., 2005), que, em Portugal, se tem vindo a verificar (**Figura 2**). Pode garantir-se hoje que 98 % da água é controlada, analisada e acompanhada de um crescente rigor na aplicação da legislação. Verifica-se ainda uma crescente melhoria da fiabilidade dos resultados analíticos, garantindo assim a boa qualidade da água (água segura), quando no início da década de 90 este indicador se cifrava apenas nos 50 % (RASARP, 2015).



**Figura 2** - Evolução do indicador água segura entre 1993 e 2014 (RASARP, 2015)

## 1.2. Objetivo e Âmbito

Neste relatório apresenta-se o percurso académico e a atividade profissional desenvolvida pelo candidato. A presente dissertação descreve ainda um trabalho desenvolvido pelo candidato na área laboratorial.

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade da Beira Interior, na cidade da Covilhã, fazendo parte do controlo de qualidade microbiológica e físico química que a Universidade da Beira Interior mantém com o objetivo de avaliar, garantir a qualidade da água para o consumo humano e respetivo cumprimento da legislação em vigor. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Química desta Universidade.

A avaliação da qualidade microbiológica da água distribuída na UBI, foi realizada através de amostragens mensais, efetuadas entre o ano 2014 e 2015. Os resultados obtidos encontram-se no **Anexo C**.

A Universidade da Beira interior possui neste momento quatro nascentes viáveis, sendo a captação de água de origem subterrânea. A água captada é então tratada em quatro Estações de Tratamento de Água (ETA) que a UBI dispõe neste momento.

As ETA encontram-se identificadas nas figuras seguintes e servem atualmente por rede de distribuição própria os seguintes edifícios:

- **ETA 1:** abastece a Faculdade de Ciências Sociais e Humanas (FCSH) (Polo IV) (**Figura 3**);
- **ETA 2:** abastece a Residência Pedro Álvares Cabral (PAC) (**Figura 4**);
- **ETA 3:** abastece a Reitoria, Residência I, Residência II e Serviços de Ação Social (SASUBI) (**Figura 5**);
- **ETA 4:** abastece a Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) (**Figura 6**).



**Figura 3** - Vista aérea da Faculdade de Ciências Sociais e Humanas (FCSH) e localização da ETA 1 (Fonte: GoogleMaps)



**Figura 4** - Vista aérea da Residência Pedro Álvares Cabral (PAC) e localização da ETA 2 (Fonte: GoogleMaps)



**Figura 5** - Vista aérea da Reitoria, SASUBI, Residência I, Residência II e localização da ETA 3 (Fonte: GoogleMaps)



**Figura 6** - Vista aérea da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) e localização da ETA 4 (Fonte: GoogleMaps)

Na **Tabela 1**, apresenta-se a localização de cada ponto de amostragem e a estimativa da população abrangida pela água distribuída a partir das quatro Estações de Tratamento (ETA).

**Tabela 1** - Relação das quatro ETA com as respetivas zonas de abastecimento e população servida.

N.º ETA	Zona de Abastecimento	Ref <sup>a</sup>	Ponto de Amostragem	N.º pessoas / estimativa
ETA 1	Faculdade de Ciências Sociais e Humanas (FCSH) - Polo IV	2B	Torneira no WC	1000
ETA 2	Residência Pedro Álvares Cabral (PAC)	5B	Torneira no WC	350
ETA 3	Reitoria	3A	Torneira da banca da louça (copa)	330
	Residência I	3C	Torneira no WC	
	Residência II	3D	Torneira no WC (Cons. Médico)	
	Serviços de Ação Social (SASUBI)	3E	Torneira no WC	
ETA 4	Faculdade de Ciências da Saúde (FCS)	6A	Torneira da banca da louça	550

A água distribuída nas zonas de abastecimento referidas na **Tabela 1** é obtida a partir de captações subterrâneas, previamente referidas.

### 1.3. Estrutura do trabalho

O Relatório aqui apresentado encontra-se dividido em 6 capítulos.

No capítulo um consta a estrutura do trabalho, encontrando-se aí definidos os objetivos e o âmbito.

O segundo capítulo é composto pela apresentação detalhada do percurso académico e profissional do candidato de acordo com os requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Química Industrial. Neste capítulo será dada ênfase à formação profissional adquirida que contribui para o desenvolvimento da atividade profissional do candidato.

No terceiro capítulo é efetuada uma revisão da literatura, onde são abordados os temas pertinentes ao estudo realizado.

O capítulo quatro apresenta os fundamentos práticos associados ao tema descrito e a metodologia utilizada na prática laboratorial.

Sendo um dos objetivos de um laboratório de microbiologia, assegurar o controlo analítico da qualidade de uma água, efetuar a respetiva interpretação e leitura dos resultados obtidos, vem-se, através deste trabalho, exemplificar no capítulo cinco, com o caso prático apresentado.

O trabalho finaliza com o capítulo seis, onde se descrevem as principais conclusões e perspetivas futuras.

No anexo A encontram-se, os documentos comprovativos de Habilitações, Declarações e Certificados de Formação. No anexo B encontram-se a descrição dos métodos analíticos utilizados neste trabalho e por fim, no anexo C, encontram-se os resultados analíticos correspondentes aos pontos de amostragem, no período entre 2014 e 2015.

# Capítulo 2

## 2. Percurso Académico e Profissional

### 2.1 Formação Académica

- 2.º Ciclo do Curso Bietápico de Licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar, na Escola Superior Agrária de Castelo Branco do Instituto Politécnico de Castelo Branco, em 5 de dezembro de 2008, com a classificação final de 12 (doze) valores.
- Licenciatura em Engenharia Alimentar na Escola Superior Agrária de Coimbra do Instituto Politécnico de Coimbra no dia 15 de julho de 2008. O grau de Licenciado foi conferido nos termos do Cap. II, do Decreto-Lei n.º 74/2006 de 24 de Março.
- Bacharelato em Engenharia das Indústrias Agro-Alimentares, na Escola Superior Agrária de Coimbra do Instituto Politécnico de Coimbra, em 19 de dezembro de 1996, com a classificação final de 11 (onze) valores.

### 2.2 Percurso Profissional

Entre março de 1998 a outubro de 2000, o candidato iniciou a sua atividade profissional na empresa Vidrolab 2 - Vidros e Material de Laboratório, Lda. em Perosinho, concelho de Vila Nova de Gaia, distrito do Porto. Nesta empresa, e reportando ao Diretor comercial, assumiu o cargo de Técnico comercial com as seguintes funções: Apresentação, promoção, venda e respetivo acompanhamento de sistemas de colheita de sangue e reagentes de diagnóstico clínico em laboratórios de análises clínicas, centros de investigação e hospitais.

- Equipamentos, material de laboratório incluindo consumíveis em universidades e empresas do setor alimentar.
- Promoveu repetidas ações de “merchandising” e promoção de vendas na área da microbiologia clínica e alimentar.

De novembro de 2000 a março de 2001 a sua evolução profissional, decorreu na empresa Tecnilac - Técnicas Agro-Alimentares, Lda. com sede na Zona Industrial do Mundão, concelho de Viseu. Esta empresa especializada no fornecimento de produtos destinados às indústrias agro-alimentares destaca-se pela sua importância na área da Biotecnologia e na comercialização de equipamentos específicos para a produção de queijos, onde o candidato assumiu o cargo de Técnico comercial, tendo como responsabilidade:

- Comercialização, assessoria e consultoria de produtos na área da biotecnologia, nomeadamente, fermentos lácteos, meios de cultura, coalhos, coagulantes microbianos, enzimas, aromas, revestimentos antifúngicos, etc.
- Equipamentos, tais como moldes, multimoldes, cubas, pasteurizadores, tanques de refrigeração, prensas e equipamento de frio para produção de queijos e derivados em algumas indústrias de laticínios que ainda hoje ocupam uma posição líder neste segmento de mercado.

Desde 6 maio de 2002, o candidato ingressou na carreira Técnica na UBI, exercendo funções de Técnico de 2.ª classe, no Departamento de Química. No ano de 2008 e de acordo com a Lei n.º 12-A/2008 de 27 de fevereiro que “Estabelece os regimes de vinculação, de carreiras e de remunerações dos trabalhadores que exercem funções públicas” transitou para a carreira de Técnico Superior. As principais funções desempenhadas pelo candidato ao longo da sua permanência na Carreira Técnica na UBI descrevem-se em seguida, com mais detalhe.

- Participação e acompanhamento em colaboração com o Presidente do Departamento de Química, Prof. Doutor João Queirós no ano de 2002, pelo planeamento e instalação do novo Laboratório de Microbiologia no Departamento de Química.
- Responsável pelo planeamento e aquisição do equipamento, consumíveis, reagentes e meios de cultura para o Laboratório de Microbiologia.
- Responsável técnico da área de Microbiologia em águas e produtos alimentares no Departamento de Química.
- Responsável pela área de amostragem/recolha de amostras do laboratório- Responsável pela implementação de métodos de ensaio, principalmente no relacionado com novas técnicas de análise, em águas destinadas a consumo humano.
- Responsável pela implementação de procedimentos de validação de métodos de análise.
- Realização da validação interna dos resultados das análises e relatórios de ensaio.
- Responsável pela elaboração do plano de manutenção e calibração de equipamentos.
- Gestão e controlo analítico da qualidade da água para consumo humano da própria UBI como para empresas e particulares em regime de prestação de serviços;
- Suporte técnico-laboratorial especializado a projetos de investigação e acompanhamento de aulas práticas nas áreas da Microbiologia e Bioquímica às licenciaturas de Bioquímica, Química Medicinal, Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia.
- Apoio e acompanhamento, nos trabalhos laboratoriais, aos alunos das licenciaturas de Bioquímica, Química Medicinal, Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia.

## 2.3. Outras Atividades: Formador

Portador do Certificado de Aptidão Profissional nº EDF413248/2006, emitido pelo IEFP a 9 de agosto de 2006, ministrou as seguintes ações de formação:

- **2011 e 2010** - Formador na Unidade de formação "Microbiologia Ambiental" (50 horas), componente prática em laboratório, no âmbito do Curso de Especialização Tecnológica (CET) em "Qualidade, Ambiente e Segurança" (Nível IV) - Turma 1 e Turma 2, promovido pela Associação para a Formação Tecnológica e Profissional da Beira Interior (AFTEBI) e ministrado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Química da UBI nos seguintes módulos:
  - Noções Básicas de Biossegurança; Regras básicas de comportamento num laboratório de microbiologia; Métodos de esterilização de equipamento e material.
  - Isolamento e enumeração de microrganismos cultiváveis presentes numa amostra de solo.
  - Observação microscópica de bactérias; coloração simples, de Gram, de endósporos e cápsulas.
  - Estudo de crescimento microbiano (contagem de células viáveis por diluição em placa, métodos turbidimétricos, contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.
  - Análise bacteriológica de uma amostra de água para consumo humano.
- **2009** - Formador dos módulos de "Nutrição" (50 horas) e "Nutrição e Dietética" (50 horas) no âmbito do Curso de Técnico/a de Controlo de Qualidade Alimentar (Nível 3), promovido pela AD Inova - Agência para o Desenvolvimento e Inovação.
- **2006** - Formador do Curso de "Segurança Alimentar" na Empresa Panisserra - Produtos de Panificação e promovido pela Avalforma - Formação e Consultoria, Lda., nos seguintes módulos:
  - Política da Empresa no Sistema de Segurança Alimentar (3 horas);
  - Legislação Alimentar (12 horas);
  - Tecnologias de Informação e Comunicação (9 horas).
- **2006** - Formador do Curso de "Técnicas de Boas Práticas" na Empresa Panisserra - Produtos de Panificação e promovido pela Avalforma - Formação e Consultoria, Lda. nos seguintes módulos:
  - Introdução à Higiene e Qualidade Alimentar (3 horas);
  - Noções Básicas de Microbiologia (6 horas);

- Principais Fontes de Contaminação (3 horas);
- Higiene Pessoal (3 horas);
- Limpeza e Desinfecção (6 horas);
- Manuseamento Seguro dos Alimentos (6 horas);
- Análise de Casos Práticos (3 horas).

## 2.4. Formação Profissional e Estágios

### 2.4.1. Cursos de Formação

- “Base de dados Access”, ministrado no CFIUTE-UBI, de 17 a 31 de maio de 2013, com a duração de 25 horas, com aprovação.
- “Gestão e Aprovisionamento de Compras Públicas”, ministrado no CFIUTE/UBI, de 5 a 20 de dezembro de 2011, tendo obtido a classificação final de 16 (dezassexes) valores.
- “Sistemas de Gestão da Qualidade: Norma ISO 9001:2008; OSHAS 18001:2007 e ISO 14001:2004, com a duração de 25 horas, ministrado no CFIUTE/UBI, de 8 a 22 de setembro de 2011, tendo obtido a classificação final de 19 (dezanove) valores.
- “Higiene e Segurança no Trabalho”, com a duração de 25 horas, ministrado no CFIUTE/UBI, de 10 a 27 de janeiro de 2011, tendo obtido a classificação final de Muito Bom.
- “Citometria de Fluxo em Microbiologia”, com a duração de 7 horas, ministrado na UBI-Faculdade de Ciências da Saúde, no dia 19 de janeiro de 2008.
- “Qualidade da Água para Consumo Humano”, com a duração de 30 horas, ministrado pelo CITEVE, Covilhã, de 11 de setembro a 20 de novembro de 2006, com aprovação.
- “Formação Pedagógica Inicial de Formadores”, com a duração de 100 horas, ministrado pela Avalforma - Formação e Consultoria, Lda., Covilhã, de 20 de março a 23 de maio de 2006, tendo obtido a classificação final de 17 (dezassete) valores.
- “HACCP - Segurança Alimentar”, com a duração de 100 horas, ministrado pela Avalforma - Formação e Consultoria, Lda., Castelo Branco, de 17 de setembro a 22 de novembro de 2003, tendo obtido a classificação final de Bom.

## 2.4.2. Participação em Seminários e Congressos

- Seminário “PCR em tempo real - Vantagens para a indústria alimentar e saúde pública duma metodologia super rápida para a deteção de microrganismos patogénicos”, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 30 de março de 2012.
- Workshop “Acreditação e Validação de Métodos Bioanalíticos”, UBI-Faculdade de Ciências da Saúde”, 11 de maio de 2011.
- Sessão temática “Doenças da vinha e do vinho”, CITEVE Alimentar, Covilhã, 12 de maio de 2011.
- Seminário “GHS (Global Harmonised System / Sistema mundial harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos) - Significado e aspetos práticos”, UBI-Faculdade de Ciências da Saúde, 17 de fevereiro de 2011.
- Seminário “Segurança Alimentar - Legislação e Certificação”, UBI-Faculdade de Ciências da Saúde, 26 de novembro de 2010.
- Simpósio “Inovação e Segurança Alimentar”, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, novembro de 2007.
- Seminário “Segurança Biológica”, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, abril de 2006.
- “Jornadas da Alimentação 2004 - Higiene, Segurança, Qualidade e Inovação”, organizado pela FIPA, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, junho de 2004.
- Seminário “Tratamentos Físicos e Físico-Químicos em Águas Residuais”, APEMETA, Lisboa, 27 de novembro de 1995.
- 4.º Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, 6 a 8 de abril de 1994.

### 2.4.3. Estágios

- **Outubro de 1995** - Estágio na empresa Beiralacte - Lacticínios Artesanais da Beira Baixa, Lda., Alcaria - Fundão, na área da biodegradação de um efluente líquido industrial de uma queijaria.

# Capítulo 3

## 3. Revisão Bibliográfica

### 3.1. A água

Para além do oxigénio, a água é o elemento mais importante para a conservação da vida. O acesso a água potável é um pré-requisito essencial para uma vida saudável (Rubino e Salgado, 2011).

A qualidade da água tornou-se um tema de extrema importância para a saúde pública no final do século XIX e início do século XX. Anteriormente, a qualidade era apenas associada a aspetos técnicos e sensoriais, tais como a cor, o gosto e o odor (Freitas e Freitas, 2005).

Na Europa, a atual norma de qualidade de água para fins de consumo humano tem abrangência em todos os países da comunidade europeia. A *Drinking Water Directive (DWD) 98/83/EC* é submetida a cada cinco anos a um processo de revisão, que tem como principal objetivo definir estratégias relativas à gestão do sistema de produção de água potável, no sentido de propor a inclusão de novos parâmetros químicos e biológicos, a revisão dos limites máximos de contaminação dos parâmetros já existentes e a discussão sobre tendências de gestão de riscos no setor (Freitas e Freitas, 2005).

### 3.2. Água tratada

Nem sempre a água encontrada na natureza é considerada potável, sendo então necessários tratamentos para que a torne adequada ao consumo humano e que garantam a sua qualidade desde a saída da estação de tratamento (ETA) até ao consumidor.

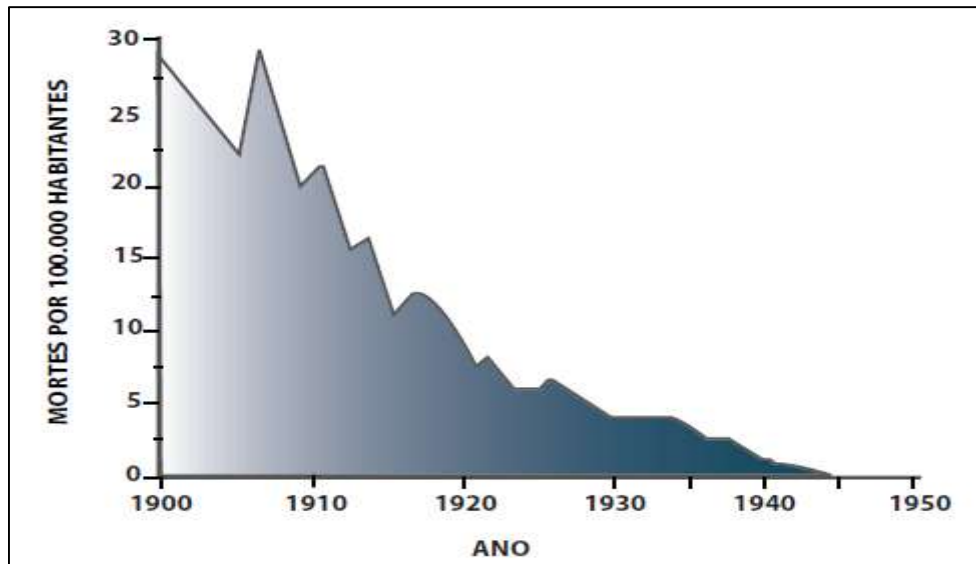
O cloro foi descoberto em 1808 por Sir Humprey Davy e teve as suas propriedades bactericidas demonstradas laboratorialmente pelo bacteriologista Koch em 1881 (Barros de Macêdo e Barra, M.M., 2003).

O uso contínuo do cloro só ocorreu a partir de 1902 na Bélgica, com o chamado refinamento de cloração, isto é, a determinação das formas de cloro combinado e livre e a cloração baseada em controlos bacteriológicos (Meyer, 1994 e Laubusch, 1971, citado por Barros de Macêdo, J.A. e Oliveira, F.S., 2010).

Nos Estados Unidos da América, um dos primeiros usos contínuos da prática da cloração foi realizada na cidade de Jersey City, no Estado de Nova Jersey em 1908. As indústrias alimentares também rapidamente aderiram ao uso do cloro para melhorar a qualidade da água, nomeadamente na higiene e limpeza de utensílios, equipamentos e instalações. Em 1939,

quando o “United States Milk Ordinance and Code” recomendou o cloro como agente de sanificação de equipamentos, a sua utilização já era uma prática totalmente difundida (Barros de Macêdo, J.A. e Oliveira, F.S., 2010).

O uso de derivados clorados foi fundamental para a melhoria da qualidade de vida e do aumento da perspectiva e longevidade de vida da população, o que é demonstrado pela **Figura 7**:



**Figura 7** - Redução do número de casos fatais de febre tifoide nos Estados Unidos de 1900 a 1950 após implementação de sistemas de desinfecção pelo uso de derivados clorados (Fonte: Christman, 2001; Gruber *et al*, 2001, citado por Barros de Macêdo, J.A. e Oliveira, F.S., 2010)

Os processos de desinfecção têm como objetivo a destruição ou inativação de organismos patogênicos, capazes de produzir doenças, ou de outros organismos indesejáveis. A desinfecção não implica, necessariamente, a destruição completa de todas as formas vivas (esterilização), embora muitas vezes o processo de desinfecção seja levado até ao ponto de esterilização (Meyer, S.T., 1994).

O uso do cloro no tratamento da água pode ter como objetivo a desinfecção (destruição de microrganismos patogênicos), a oxidação (alterações das características da água pela oxidação dos compostos nela existentes) ou ambas as ações ao mesmo tempo (Meyer, S.T., 1994).

As características necessárias para um bom desinfetante são:

- Capacidade de destruir, num tempo razoável, os organismos patogênicos a serem eliminados, na quantidade em que se apresentam e nas condições encontradas na água;
- O desinfetante não deve ser tóxico para o homem e para os animais domésticos e, nas dosagens usuais, não deve causar à água cheiro e gosto que prejudiquem o seu consumo;

- O custo de utilização deve ser razoável, além de apresentar facilidade e segurança no transporte, manuseamento e aplicação;
- A concentração, na água tratada deve ser fácil e rapidamente determinável;
- Deve produzir concentrações residuais resistentes na água, de maneira a constituir uma barreira sanitária contra eventual recontaminação antes de ser consumida.

O cloro e os seus compostos são agentes oxidantes fortes. Em geral, a reatividade do cloro diminui com o aumento do pH e a sua velocidade de reação aumenta com a elevação da temperatura.

Quando o cloro é adicionado a uma água quimicamente pura ocorre a reação representada pela equação (1) (Degrémont, 1979, citado por Meyer, S.T., 1994).



Na temperatura ambiente, o tempo de reação é de décimas de segundo. Em soluções diluídas e  $\text{pH} > 4,0$ , o equilíbrio da reação é deslocado para a direita, ficando pouco  $\text{Cl}_2$  em solução. Em valores de pH mais baixos, a reação predominante é no sentido de formação de cloro. O ácido hipocloroso (HOCl), formado pela adição de cloro à água, dissocia-se rapidamente, equação (2) (Degrémont, 1979, citado por Meyer, S.T., 1994).

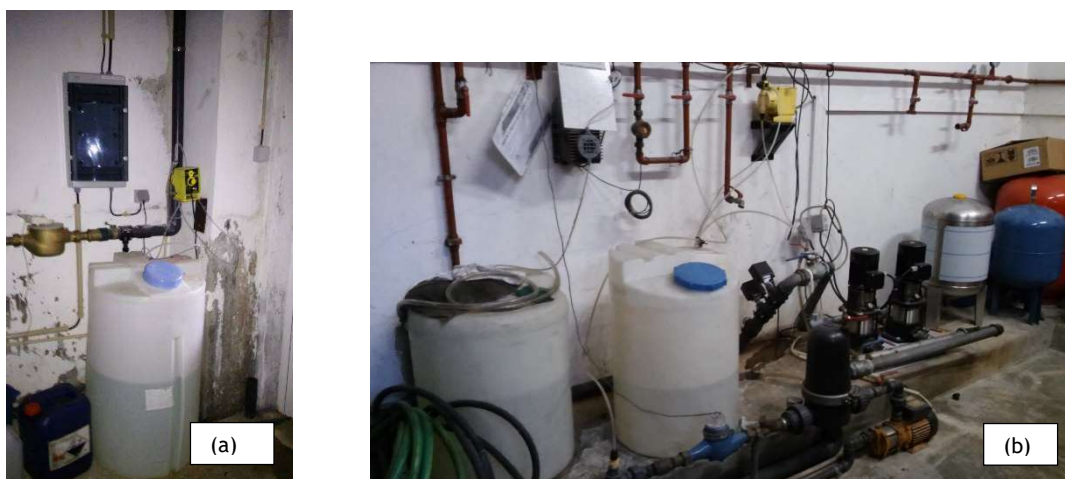


A ação desinfetante e oxidante do cloro é controlada pelo ácido hipocloroso, um ácido fraco. Em solução aquosa e valores de pH inferior a 6,0, a dissociação do ácido hipocloroso é fraca sendo predominante a forma não dissociada (HOCl).

As águas de abastecimento público, em geral, apresentam valores de pH entre 5,0 e 10,0, quando as formas presentes são o ácido hipocloroso (HOCl) e o íão hipoclorito (OCl) (Meyer, S.T., 1994).

Assim, para um tempo de contacto específico, a concentração de cloro a ser utilizada terá de ser maior no Inverno do que no Verão. No Verão, dadas as temperaturas serem mais elevadas, é maior o crescimento bacteriano, sendo assim necessário usar concentrações mais elevadas de cloro. O aumento da temperatura também favorece a depleção de cloro no meio. Isto acabará por ter efeito nos subprodutos da cloração (Beleza, J.M.B.B., 2005).

Nas quatro ETA da UBI é utilizado o hipoclorito de sódio (NaClO) como desinfetante, não só pelo seu baixo custo de aquisição e eficiência mas também pela facilidade de manipulação e utilização. O produto é fornecido sob a forma de solução aquosa, com uma concentração em cloro ativo  $\leq 15\%$ . Para uma otimização do processo de desinfecção, nomeadamente a garantia da aplicação correta de desinfetante, existe em cada ETA um doseador hidráulico em que o cloro é doseado em modo automático, ou seja, a quantidade de cloro injetada é sempre ajustada em função do caudal a tratar (**Figura 8**).



**Figura 8** - Aspeto geral do sistema de desinfecção de água numa ETA da UBI; (a) cuba da solução de hipoclorito de sódio e (b) doseador hidráulico de cloro (Fonte: Autor).

Para garantir a proteção sanitária da água até à torneira do consumidor, é essencial assegurar um teor de cloro residual livre ao longo do sistema de distribuição. A existência de desinfetante residual é apenas uma medida preventiva do risco de contaminação da água tratada na rede de distribuição. Este parâmetro é aferido sempre que se efetuam amostragens de água através de fotómetro portátil (Hanna instruments, HI 95701).

De acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS), uma concentração de  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  em cloro residual livre na água, para um tempo de contacto de trinta minutos, é suficiente como garante de uma desinfecção satisfatória, no entanto valores superiores, podem causar problemas de paladar e de odor na água (Recomendação IRAR n.º05/2007).

Assim o cloro residual serve não só como desinfetante mas como um parâmetro de controlo ao longo da rede, pois se se verificar uma queda dos valores deste composto abaixo dos níveis normais, será um indicador de uma eventual contaminação da rede, facilitando uma resposta rápida quando comparada com uma monitorização microbiológica (Beleza, J.M.B.B., 2005).

O sistema de cloragem deve ser objeto de uma atenção permanente por parte dos serviços técnicos. Se possível, deve ser efetuada uma visita diária às instalações para verificar o normal funcionamento do equipamento instalado e o nível da solução de hipoclorito de sódio na cuba.

### 3.3. Qualidade microbiológica da água para consumo humano

Uma grande variedade de doenças podem ser devidas à presença de vírus, bactérias e protozoários veiculados pelas águas ou alimentos contaminados com matérias fecais. São utilizados organismos indicadores de qualidade da água, como um índice da possível contaminação da água com organismos patogênicos humanos.

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA possui uma lista com mais de 500 agentes patogênicos identificados que podem suscitar alguma preocupação em águas potáveis, portanto com tratamento. Esta lista está disponível e pode ser consultada em: [http://www.epa.gov/safewater/ccl/pdfs/report\\_ccl3\\_microbes\\_universe.pdf](http://www.epa.gov/safewater/ccl/pdfs/report_ccl3_microbes_universe.pdf) (Ashbolt, N.J., 2015).

Segundo Ferreira e Sousa, (1998), não existe o microrganismo indicador ideal. A seleção de um microrganismo como indicador da qualidade da água, obedece aos seguintes critérios possíveis: (1) deve ser apropriado para permitir a análise de todos os tipos de água; (2) deve estar presente sempre que existam organismos patogênicos; (3) deve existir em número superior aos organismos patogênicos presentes; (4) deve ser mais resistente a eventuais desinfecções do que os organismos patogênicos presentes; (5) não deverá reproduzir-se no meio aquático, após eventuais desinfecções; (6) deverá ter uma distribuição aleatória numa massa de água; (7) não deverá ter o seu crescimento inibido pelo crescimento de outros organismos; (8) não deverá ser patogênico para o Homem; (9) a sua pesquisa e identificação deverá ser possível, recorrendo a técnicas laboratoriais de fácil execução, rápidas e inequívocas; (10) as técnicas laboratoriais de identificação deverão ter uma grande especificidade e sensibilidade e serem passíveis de detetar níveis baixos do indicador; (11) a sua concentração em águas contaminadas deverá ter alguma relação direta com o nível de poluição de origem fecal.

Os indicadores mais correntemente utilizados como indicadores de poluição de origem fecal são designados por indicadores clássicos, e incluem: o grupo dos microrganismos coliformes totais e *Escherichia coli*; os enterococos fecais; os clostrídios anaeróbios, esporulados, redutores de sulfito.

O desenvolvimento de organismos heterotróficos, também designados como número de colónias a 22 °C e 36 °C, permitem efetuar uma estimativa do grau de poluição hídrica com matéria orgânica facilmente biodegradável (Ferreira e Sousa, 1998).

As diretrizes atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendam a *Escherichia coli* e/ou os coliformes termotolerantes (fecais) como indicadores da eficácia do processo de desinfecção de uma água (Gruber *et al*, 2014).

### 3.3.1. Bactérias coliformes

São bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, dos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Podem ser encontradas no ambiente, em solos e são habitantes usuais do trato intestinal do homem e de outros animais.

A designação *Enterobacteriaceae* tem sido complicada e baseada em características bioquímicas e antigénicas. Recentemente a aplicação de novas tecnologias, como a hibridação do DNA resultou em algumas alterações na sua classificação. Em géneros e espécies novas foram descobertos, algumas espécies incomuns e raras e, muitas também foram reclassificadas passando para outros géneros como por exemplo *Enterobacter sakazakii* para *Cronobacter sakazakii* (Iversen *et al*, 2007).

O grupo coliforme é definido como sendo constituído por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram-negativas, não esporuladas e que apresentam uma morfologia bacilar. Fermentam a lactose, produzindo gás e ácido em 48 horas a uma temperatura de 37 °C. Também são capazes de crescer na presença de sais biliares ou agentes tensioativos e podem apresentar atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (Marquezi, M.C., 2010).

Estas bactérias com capacidade de sobreviver e multiplicar-se na água, não sendo os melhores indicadores da presença de microrganismos patogénicos fecais, constituem contudo um bom indicador do estado de higienização e de integridade dos sistemas de distribuição e da presença potencial de biofilmes (APDA, 2012). Imediatamente após a desinfeção estas bactérias devem estar ausentes, pelo que a sua presença indicia um tratamento inadequado.

### 3.3.2. *Escherichia coli*

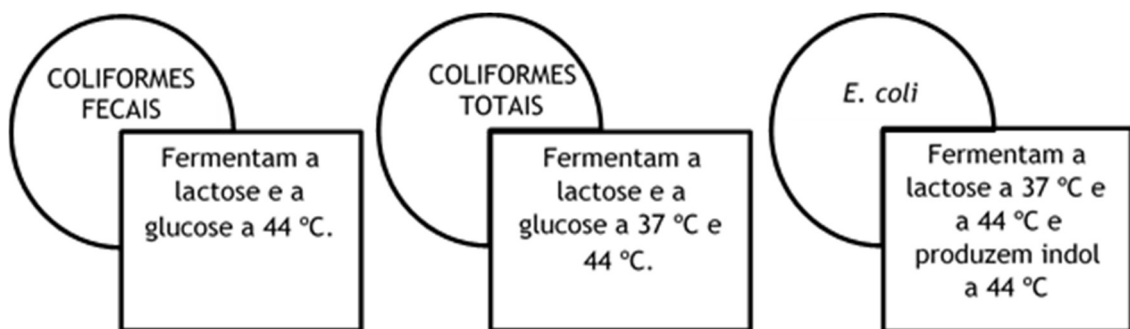
Em 1855 o pediatra Theodore Escherich, descreveu um microrganismo que era encontrado com frequência nas fezes humanas e causava diarreia infantil, apelidando-o *Bacterium coli*. Em 1958 esta bactéria passou a designar-se *Escherichia coli* em homenagem ao autor da sua descoberta. Em 1892 foi proposto a *E. coli* como indicador de contaminação fecal em água, uma vez que esta bactéria é encontrada no intestino humano e de animais de sangue quente. É o principal representante do grupo termotolerante e o indicador mais específico de contaminação fecal e da eventual presença de organismos patogénicos. Os microrganismos termotolerantes diferenciam-se dos coliformes totais por fermentarem lactose com produção de gás a uma temperatura de  $44,5 \pm 0,2$  °C em 24 horas (Conte *et al*, 2004).

A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* e ao grupo coliforme, é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, que pode ou não apresentar motilidade, capaz de

crescer em ambientes aeróbios ou anaeróbios facultativos. O seu metabolismo é tanto respiratório como fermentativo, produtora de ácido láctico pela fermentação da glicose e da lactose, catalase positiva e capaz de reduzir nitrato a nitrito (Marquezi, M.C., 2010).

Devido à grande degradação dos recursos hídricos, a pesquisa de *E. coli* em águas tem assumido uma importância fundamental e como consequência têm sido desenvolvidos diversos métodos rápidos de enumeração e identificação desta espécie.

O grupo de coliformes inclui bactérias não exclusivamente de origem fecal, podendo ocorrer naturalmente no solo, água e plantas, sendo importante a sua distinção como se pode verificar na **Figura 9**.



**Figura 9** - Diferenciação do grupo coliforme (Fonte: Conte *et al*, 2004).

### 3.3.3. Número de colônias a 22 °C e 36 °C

O número de colônias, também designada por número de microrganismos viáveis, contagem total ou mesófilos a 22 °C e 36 °C, engloba um largo espectro de microrganismos heterotróficos, incluindo bactérias e fungos da flora microbiana natural da água, tipicamente não nocivos, e têm origem em diversas fontes de poluição.

O espectro de microrganismos detetado por este método inclui: organismos sensíveis aos processos de desinfecção como, por exemplo, a cloração, radiações ultravioleta e ozonização, tais como as bactérias coliformes; organismos resistentes aos processos de desinfecção, como os esporulados; e microrganismos que rapidamente proliferam na água tratada na ausência de desinfetante residual. No entanto esta pesquisa deteta apenas uma parte dos microrganismos presentes numa água.

Alguns destes organismos têm a capacidade de se multiplicar na água e em superfícies em contato com a água, tais como os biofilmes e têm uma excelente capacidade de proliferar em algumas das operações unitárias dos processos de tratamento. Os fatores mais importantes para o seu crescimento na água são a temperatura, a disponibilidade de nutrientes, a ausência de desinfetante e a estagnação da água. A sua pesquisa tem pouco valor como indicador da

presença de microrganismos patogênicos, mas pode ter um contributo essencial na monitorização operacional como indicador da eficiência do tratamento e da desinfeção da água, bem como da higienização e da integridade do sistema de distribuição e monitorização da presença de biofilmes (APDA, 2012).

Um aumento nas colónias a 36 °C pode ser indicador de contaminação, particularmente se não for acompanhado por um aumento similar nas contagens a 22 °C. As bactérias recuperadas na contagem a 22 °C representam, geralmente, bactérias presentes naturalmente na água e não têm relevância significativa (Antunes da Silva, M., 2012).

As desinfeções físicas e químicas conseguem reduzir significativamente a sua presença em 99-99,9%, mas nada impede que na ausência de desinfetante residual, os microrganismos possam rapidamente voltar a crescer (APDA, 2012).

O Decreto-lei n.º 306/2007, de 27 de agosto define como valor paramétrico “Sem alteração anormal” para estes dois parâmetros, não sendo desejável que o número de colónias a 22 °C e a 36 °C seja superior a 100 N/ml e 20 N/ml, respetivamente.

#### **3.3.4. *Clostridium perfringens***

O grupo dos microrganismos designados por clostrídios anaeróbios, esporulados, redutores de sulfito e de grande interesse como indicador de poluição de origem fecal, *Clostridium perfringens*. Caracteriza-se por ser um organismo Gram-positivo, em forma de bastonete, anaeróbio estrito, formando esporos que são excepcionalmente resistentes a condições ambientais aquáticas adversas, incluindo radiação ultravioleta, pH extremo. Metabolicamente são muito diversos, com temperatura ótima de crescimento entre os 10 °C e os 65 °C. Habitantes do trato intestinal do homem e de animais de sangue quente, este grupo de organismos é relativamente homogéneo, resistente à depuração natural e, não menos importante, possui a característica de ser resistente a processos de desinfeção, tal como a cloração, podendo sobreviver por períodos prolongados (Ferreira e Sousa, 1998). A presença de *Clostridium perfringens* em águas subterrâneas na ausência de *E. coli* e enterococos é indicativa de ocorrência de poluição no passado e sugere que a fonte é responsável por contaminação intermitente (ARS Norte, 2013).

### 3.3.5. Enterococos intestinais

Os Enterococos intestinais constituem um subgrupo de organismos definidos como estreptococos fecais, compreendendo espécies do género *Streptococcus*. Este subgrupo é composto pelas espécies *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae*, e veio substituir o parâmetro indicador estreptococos fecais, por ser mais específico de uma eventual poluição fecal. Para além de indicadores de poluição fecal, são ainda considerados como bons indicadores após reparação ou intervenção no sistema de distribuição.

Estas bactérias são Gram-positivas, toleram grandes amplitudes térmicas, são relativamente tolerantes ao cloreto de sódio em concentrações aproximadas de 6,5 % e a pH alcalino. A azida sódica e sais biliares, que inibem o crescimento da maioria dos microrganismos, são bem tolerados pelos enterococos e utilizados como meios seletivos. São anaeróbias facultativas e ocorrem isoladamente, em pares ou em cadeias curtas. A maioria das espécies não se multiplica em ambientes aquáticos. O número de enterococos intestinais em fezes humanas é geralmente numa ordem de grandeza menor do que a *E. coli* e tendem a sobreviver mais tempo em ambientes aquáticos, sendo mais resistentes à desinfeção por cloro (APDA, 2012).

## 3.4. Qualidade da água para consumo humano - Enquadramento legal

Os relatórios do controlo da qualidade da água em Portugal, elaborados a partir do ano de 2004, tiveram como referência a Diretiva 98/83/CE, do Conselho de 3 de novembro, transposta inicialmente através do Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de setembro, tendo sido mais tarde alterado pelo Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, que entrou em vigor no dia 1 de janeiro de 2008.

O principal objetivo do Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto é garantir e proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação da água e assegurar a disponibilização universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada, designadamente, não deve conter nenhum microrganismo, parasita ou substância em quantidade ou concentração que possa constituir perigo potencial.

De acordo com o Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto, a água destinada ao consumo humano, é definida como:

- *Toda a água, no seu estado original ou depois do tratamento, que é usada para beber, cozinhar, preparar alimentos ou outros usos domésticos, independentemente da sua*

*origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais;*

- *Toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para o fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinadas ao consumo humano, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada.*

Este decreto de lei define:

- As normas de qualidade a que a água destinada ao consumo humano deve respeitar;
- As obrigações de qualidade de água disponibilizada pelas entidades gestoras;
- O programa de controlo da qualidade da água que as entidades gestoras devem dispor;
- O procedimento em caso de incumprimento;
- As regras de aptidão dos laboratórios de ensaio;
- As regras de fiscalização e regime de contraordenação.

**Tabela 2** - Lista de parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para águas de consumo humano, Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto.

Parâmetro	Unidade	Valor paramétrico	Observações
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	Número/100ml	0	
Bactérias coliformes	Número/100ml	0	
Enterococos	Número/100ml	0	
<i>Clostridium perfringens</i>	Número/100ml	0	
Número de colónias a 22 °C	Número/ml	Sem alteração anormal	Não é desejável que o seu valor seja superior a 100 ufc/ml
Número de colónias a 36 °C	Número/ml	Sem alteração anormal	Não é desejável que o seu valor seja superior a 20 ufc/ml

A Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, IP (ERSAR, IP, antigo IRAR) é a autoridade competente e atual para a coordenação e fiscalização da aplicação do Decreto-lei n.º 306/2007, de 27 de agosto (art. 3º).

De acordo com o Decreto referido, os ensaios de controlo da qualidade microbiológica, nomeadamente os constantes na **Tabela 2**, são realizados com recurso aos métodos analíticos especificados pelas seguintes normas:

- SM 9222 B para a análise das bactérias coliformes;
- SM 9222 D para a análise da *Escherichia coli (E. coli)*;
- ISO 7899-2 para a análise de Enterococos;

- ISO 6461-2 para a análise de *Clostridium perfringens* (incluindo esporos);
- ISO 6222 para a análise do número de colónias a 22 °C e a 36 °C;

Todas as análises de água devem dar origem a um documento, o boletim analítico, que deverá ser transmitido pelo responsável do laboratório. Os resultados das análises são em regra influenciados pela origem da água (OMS, 2011).

### 3.5. Nutrição microbiana

As células são compostas fundamentalmente de água e macromoléculas, que por sua vez, se decompõem em unidades mais pequenas denominadas monómeros. A nutrição microbiana consiste em fornecer às células os ingredientes químicos que necessitam para fazer monómeros. Estes compostos químicos são os nutrientes (Madigan *et al*, 2004). Os nutrientes são necessários por dois objetivos bem definidos: para fins energéticos (reações de manutenção) e para fins biosintéticos (reações plásticas ou anabolismo) (Madigan *et al*, 2004 e Schlegel, H.G., 1997).

Os seres vivos necessitam de matérias-primas ou nutrientes para a obtenção de energia e participar na elaboração de novos compostos celulares. Os nutrientes são substâncias que se utilizam na biossíntese e na produção de energia e como consequência, são necessários para o crescimento bacteriano (Prescott *et al*, 1999). Nem todos os organismos necessitam dos mesmos nutrientes e das mesmas quantidades, no entanto, de todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais (Ferreira e Sousa, 1998).

Desde o ponto de vista da composição química das células distinguem-se 11 macronutrientes, isto é, nutrientes que são exigidos em quantidades relativamente elevadas e que desempenham papéis fundamentais na estrutura e metabolismo da célula. Mais de 95 % do peso seco da célula microbiana está constituída por carbono, oxigénio, hidrogénio, azoto, enxofre, fósforo potássio, cálcio magnésio e ferro (Ferreira e Sousa, 1998; Schlegel, H.G., 1997).

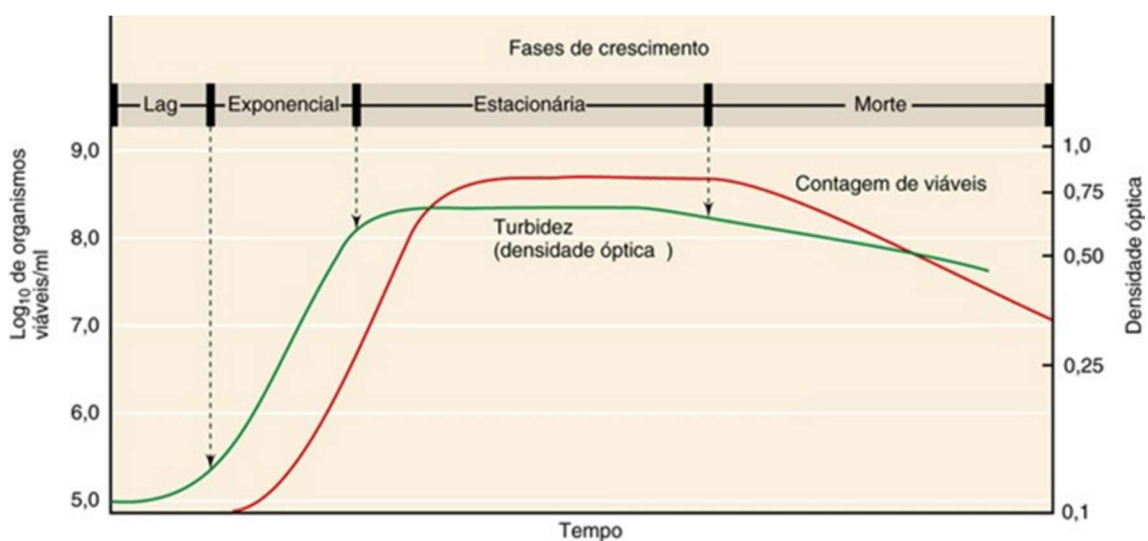
Os micronutrientes ou oligoelementos, exigidos em menores quantidades são muito importantes para a atividade de certas enzimas que funcionam como cofatores, facilitando a catálise de reações e a manutenção da estrutura das proteínas. Incluem-se o manganês, cobalto, cobre, molibdénio e o zinco (Ferreira e Sousa, 1998; Schlegel, H.G., 1997).

### 3.5.1. Crescimento de culturas bacterianas

Em microbiologia o termo **crescimento** define-se como um incremento do número de células. O crescimento é um componente essencial da função microbiana, já que na natureza qualquer célula possui um período de vida finito e a espécie mantém-se como resultado do crescimento contínuo da população (Madigan *et al*, 2004).

O crescimento celular e a função de um dado bioproduto são resultantes da atividade fisiológica dos microrganismos e uma resposta às condições ambientais de crescimento. No caso das bactérias, que se dividem por fissão binária, a célula mãe dá origem a duas células filhas que crescem exatamente como a progenitora, o que corresponde a uma progressão geométrica  $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \dots \rightarrow 2^n$ . A primeira célula, antes de se dividir, duplica a sua massa e a quantidade de todos os seus constituintes e ainda, sintetiza a membrana celular (Schlegel, H. G., 1997). O número de células aumenta com um fator determinado em cada unidade de tempo, que se denomina crescimento exponencial. (Schlegel, H. G., 1997).

O crescimento de uma população bacteriana é estudada através da sua curva de crescimento. Quando os microrganismos são cultivados em meio líquido, denomina-se cultura em descontínuo ou em sistema fechado (batch), isto é, incuba-se em tubo de ensaio fechado ao qual se adiciona mais quantidade de meio que a inicial. Como consequência, as concentrações de nutrientes diminuem e a dos resíduos aumentam, observando-se o crescimento dos microrganismos que se multiplicam por fissão binária como o logarítmico do número de células em relação ao tempo de incubação. A curva resultante (**Figura 10**) apresenta um aspeto sigmoidal e permite distinguir quatro fases distintas de crescimento: fase de latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte ou declínio (Schlegel, H. G., 1997).



**Figura 10** - Curva de crescimento típica de uma cultura bacteriana.

### **Fase de latência**

Durante um certo período de tempo as células pouco ou nada se alteram, pois no imediato não possuem a capacidade de se reproduzirem no novo meio. Este período de diminuta ou escassa divisão pode durar uma hora ou vários dias. Durante este período as células não estão dormentes. A população microbiana passa por um período de intensa atividade metabólica, envolvendo principalmente a síntese de enzimas e várias moléculas (Tortora *et al*, 2012).

### **Fase exponencial:**

Nesta fase as células iniciam o processo de divisão e entram em período de crescimento exponencial. A reprodução celular é mais ativa durante este período e o tempo de geração atinge um valor constante. Como o tempo de geração é constante, uma representação logarítmica do crescimento na fase log gera uma linha reta. Nesta fase verifica-se o momento de maior atividade metabólica, sendo a preferida para fins industriais, pois o produto precisa de ser produzido de maneira eficiente (Tortora *et al*, 2012).

### **Fase estacionária:**

Se a fase de crescimento continua sem controlo, ocorre a formação de um grande número de células. No final do crescimento, a velocidade de reprodução é reduzida, o número de mortes microbianas é o equivalente ao número de células novas e a população estabiliza. A causa da interrupção do crescimento exponencial nem sempre é clara. O esgotamento de nutrientes, a acumulação de resíduos e mudanças de pH podem ser os motivos (Tortora *et al*, 2012).

### **Fase de morte ou declínio:**

Nesta fase, o número de mortes ultrapassa finalmente o número de células novas e a população entra na fase de morte ou declínio logarítmico.

Algumas espécies passam por toda a sequência de fases em poucos dias, outras mantêm algumas células sobreviventes indefinidamente (Tortora *et al*, 2012).

A duração de cada fase depende do organismo, do ambiente de crescimento, da temperatura, do pH, da atividade da água, e outros fatores (Forsythe, S.J., 2002).

### 3.5.2. Expressão matemática do crescimento bacteriano

Durante a fase exponencial, cada microrganismo divide-se em intervalos constantes. A população duplica o seu número durante um determinado período de tempo, denominado tempo de geração ou de duplicação (Prescott *et al*, 1999).

Exemplificando, vamos admitir que se inocula um tubo de ensaio com uma célula que se divide a cada vinte minutos, (Tabela 3). A população será de duas células depois de vinte minutos, de quatro células aos quarenta minutos e assim sucessivamente. Como a população duplica em cada geração, o incremento da população será exponencial, igual a  $2^n$ , em que  $n$  é o número de gerações, (Figura 11) (Prescott *et al*, 1999).

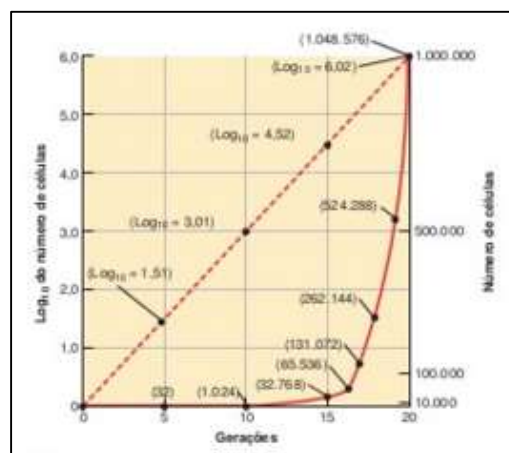


Figura 11 - Curva de crescimento exponencial logarítmica (.....) e aritmética (\_\_\_).

Estas observações podem-se expressar em equações para a determinação do tempo de geração:

Sendo que:

$N_0$  = Concentração de células no início da fase de crescimento exponencial

$N_t$  = Concentração de células após um período de tempo  $t$  de crescimento exponencial

$n$  = Número de gerações ocorridas, durante o período  $t$  de crescimento exponencial

Verifica-se que:

$$N_t = N_0 \times 2^n \quad (3)$$

Retirando  $n$ , número de gerações e, aplicando o logaritmo em base decimal, temos:

$$\log N_t = \log N_0 + n \cdot \log 2 \quad (4)$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0,301} \quad (5)$$

**Tabela 3** - Exemplo de crescimento exponencial (Fonte: Prescott *et al*, 1999).

Tempo / min	Número de divisões	$2^n$	População ( $N_0 \times 2^n$ )	$\log_{10} N_t$
0	0	$2^0=1$	1	0.000
20	1	$2^1=2$	2	0.301
40	2	$2^2=4$	4	0.602
60	3	$2^3=8$	8	0.903
80	4	$2^4=16$	16	1.204
100	5	$2^5=32$	32	1.505
120	6	$2^6=64$	64	1.806

A velocidade de crescimento durante a fase exponencial em descontínuo pode ser expressa pela constante de velocidade de crescimento ( $K$ ). Equivale ao número de gerações por unidade de tempo, expresso em gerações/hora.

$$K = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301 \cdot t} \quad (6)$$

A partir das equações anteriores pode-se calcular o tempo que uma população demora a duplicar o seu número; este é o tempo médio de geração ou tempo médio de duplicação ( $g$ ). Se a população duplicar num tempo  $t$  ( $t = g$ ), então depois de uma geração, temos:

$$N_t = 2 \cdot N_0 \quad (7)$$

Se substituirmos  $2 \cdot N_0$ , na equação de velocidade média de crescimento por  $K$ , então temos:

$$K = \frac{\log(2N_0) - \log N_0}{0,301} = \frac{\log 2 + \log N_0 - \log N_0}{0,301 \cdot g} \quad (8)$$

$$K = \frac{1}{g} \quad (9)$$

O tempo médio de geração é o inverso da constante de velocidade média de crescimento:

$$g = \frac{1}{K} \quad (10)$$

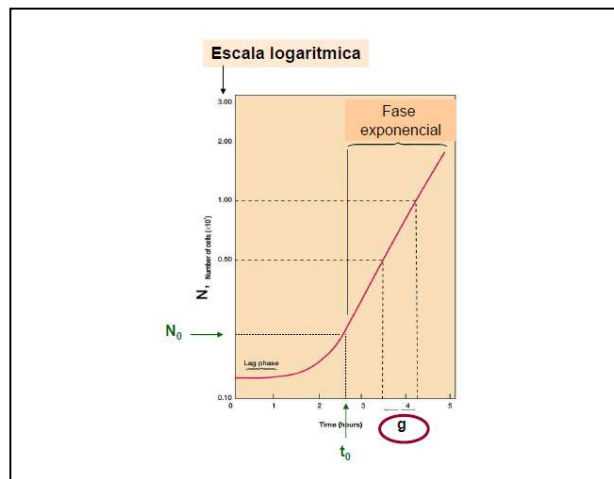
O tempo médio de geração ( $g$ ) pode ser determinado diretamente a partir de um gráfico semi-logarítmico com os dados da multiplicação (**Figura 12**), e a constante de velocidade de crescimento é calculada a partir do valor  $g$ . O tempo de geração também pode ser calculado diretamente a partir das equações anteriores.

Exemplificando, vamos admitir que uma população aumenta de  $10^3$  a  $10^9$  células em 10 horas:

$$K = \frac{\log 10^9 - \log 10^3}{(0,301) \times (10h)} = \frac{9 - 3}{3,01h} = 2,0 \frac{\text{gerações}}{h} \quad (11)$$

logo,

$$g = \frac{1}{2,0 \text{ gen/h}} = 0,5h/\text{gen ou } 30 \text{ min/geração} \quad (12)$$



**Figura 12** - Determinação do tempo de geração.

Os tempos de geração variam segundo a espécie de microrganismo as respectivas condições ambientais. Os valores dos tempos de geração em algumas bactérias poderão variar desde um

pouco menos de 10 minutos (0.17 h) até vários dias ( $t_{E. coli} = 20 - 30$  min), conforme se demonstra na Tabela 4. Na natureza estes valores são maiores do que em culturas *in vitro* (Prescott *et al*, 1999).

**Tabela 4** - Tempos de geração de alguns microrganismos (adaptado de Prescott *et al*, 1999)

Microrganismo	Temperatura/°C	Tempo de geração/horas
<i>Beneckea natriegens</i>	37	0.16
<i>Escherichia coli</i>	40	0.35
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0.43
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	0.47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	0.58
<i>Clostridium botulinim</i>	37	0.58
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	25	4.6-5.3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	<12

O intervalo entre as divisões celulares (duplicação da população) é chamado tempo de geração. Para o cálculo do tempo de geração consideraremos somente a reprodução por divisão binária que é o método mais comum. O tempo de geração depende da espécie bacteriana e, também das condições nutricionais e físicas de cultivo. O tempo de geração não corresponde a um parâmetro absoluto, uma vez que é dependente de fatores genéticos e nutricionais, indicando o estado fisiológico da cultura.

### 3.5.3. Efeitos ambientais sobre o crescimento microbiano

Os fatores que afetam o crescimento microbiano podem ser divididos em duas categorias principais: físicos e químicos. Os fatores físicos incluem a temperatura, pH e pressão osmótica. Dos fatores químicos fazem parte as fontes de carbono, azoto, enxofre, fósforo, oxigênio, elementos vestigiais e fatores orgânicos de crescimento (Tortora *et al*, 2012).

O conhecimento dos efeitos ambientais permite-nos explicar a distribuição dos microrganismos na natureza e permite que seja possível elaborar métodos que controlem ou potenciem as atividades microbianas (Madigan *et al*, 2004).

### 3.5.3.1. Fatores físicos

#### a) Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes que afetam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. A temperatura muito baixa ou muito altas, os microrganismos não crescem. No entanto os valores absolutos destas temperaturas mínimos ou máximos variam muito entre diferentes microrganismos e no geral refletem os limites de temperatura média nos seus habitats naturais (Madigan *et al*, 2004).

Frequentemente os microrganismos são agrupados ou classificados quanto à temperatura ótima de crescimento (**Figura 13**):

**Hipertermófilos ou termófilos extremos:** Alguns microrganismos membros da *Arquibactérias* têm temperaturas ótimas de crescimento de 80 °C ou mais. A temperatura mais alta conhecida para crescimento microbiano e replicação é de cerca de 121 °C, perto de chaminés hidrotermais abissais (Tortora *et al*, 2012).

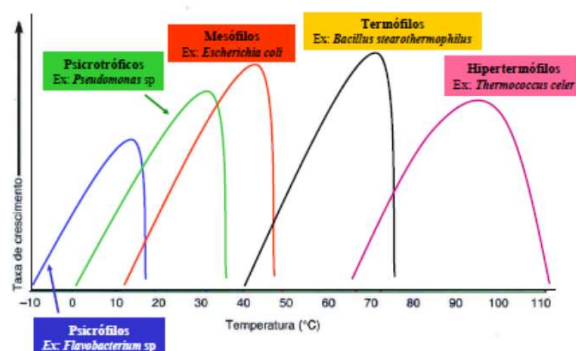
**Termófilos:** são aqueles cuja temperatura ótima (ideal) se situa entre 40 °C e 65 °C.

**Mesófilos:** são microrganismos que preferem temperaturas médias. A temperatura ótima ideal situa-se entre os 20 °C e 40 °C. São os microrganismos mais comuns. A temperatura ótima para a maioria das bactérias patogénicas é de cerca de 37 °C. Os mesófilos incluem a maioria dos organismos deteriorantes e patogénicos (Tortora *et al*, 2012).

**Psicrófilos:** são aqueles que crescem bem a 0 °C, sendo que a sua temperatura ótima de crescimento situa-se nos 15 °C ou abaixo dessa temperatura.

**Psicotróficos:** são microrganismos que crescem bem a temperaturas entre 0 °C e 7 °C mas cuja temperatura ideal é entre 20 °C e 30 °C.

Estudou-se com detalhe o crescimento em função da temperatura da *Escherichia coli*, um típico mesófilo, e foram definidas com precisão as temperaturas cardinais ou fundamentais para este microrganismo. Constatou-se que a temperatura ótima da *Escherichia coli* em meio complexo é de 39 °C, a máxima de 48 °C e a mínima de 8 °C. Estes valores podem ser susceptíveis de pequenas variações devido às diferentes estirpes (Madigan *et al*, 2004).



**Figura 13** - Velocidade de crescimento de microrganismos em função da temperatura  
(Fonte: Madigan *et al*, 2004).

Se a temperatura a que os microrganismos são expostos baixa ou aumenta, relativamente à temperatura ótima, o crescimento será mais lento. A temperaturas abaixo do valor mínimo ou acima do valor máximo, o crescimento pára, mas nem sempre a morte dos microrganismos acontece. De uma forma geral, temperaturas muito elevadas permitem destruir grande parte dos microrganismos, o mesmo não acontece com as temperaturas baixas.

A congelação não causa a morte celular, apenas os mantém num estado inativo. A posterior descongelação vai permitir que os microrganismos possam desenvolver-se (Jay, J.M., 1996).

## b) pH

O pH refere-se à acidez ou alcalinidade de uma solução. A maioria das bactérias cresce melhor numa faixa estreita de pH perto da neutralidade, entre 6.5 e 7.5. Poucas bactérias crescem num pH ácido abaixo de 4.0. No entanto, as bactérias, chamadas de acidófilas, são resistentes à acidez, como é o caso de uma bactéria quimioautotrófica que pode sobreviver em pH 1.0. O pH ótimo dos fungos e leveduras geralmente é menor que o bacteriano, normalmente é entre 5.0 <math>pH < 6.0</math>. A alcalinidade também inibe o crescimento bacteriano (Tortora *et al*, 2012).

Acredita-se que o pH adverso afeta, principalmente, a respiração dos microrganismos, por ação das suas enzimas e o transporte de nutrientes para dentro de célula microbiana. Um pH desfavorável provoca um aumento na fase exponencial da multiplicação microbiana (Teixeira de Carvalho, I., 2010).

Quando as bactérias são cultivadas em laboratório, alterações de pH por vezes interferem com o seu próprio crescimento e para tal é necessário efetuar correções para manter o pH apropriado, adicionando tampões químicos a alguns meios de cultura. As peptonas e os aminoácidos atuam como tampão, mas mais importantes são os sais de fosfato que para além

do seu efeito tampão têm a vantagem de atuar na faixa de pH e crescimento da maioria das bactérias, não apresentando toxicidade e fornecendo fósforo, um nutriente essencial (Tortora *et al*, 2012).

Quando os microrganismos estão num pH diferente do neutro, a sua capacidade de multiplicação depende da capacidade de modificar o pH adverso. Quando em pH ácido, os aminiácidos-descarboxilases de muitos microrganismos são ativados (pH próximo de 4.0), resultando na produção de aminas, que aumentam o valor de pH. Por outro lado, em pH alcalino, ocorre a ativação de aminoácidos-desaminases (pH próximo de 8.0), que produzem ácidos orgânicos, cujo efeito é a redução do valor de pH (Teixeira de Carvalho, I., 2010).

Algumas bactérias como o *Clostridium botulinum*, por exemplo, têm a propriedade de reduzir o ácido butírico, a butanol o que aumenta o pH do meio. O mesmo acontece com as *Enterobacter spp.*, que produzem acetoína a partir de ácido pirúvico (Teixeira de Carvalho, I., 2010).

O pH = 4.5 é muito importante em Microbiologia dos alimentos, pois abaixo desse valor não se verifica o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* bem como, de forma geral, das bactérias patogênicas (Hoffmann, F.L., 2001).

### c) Pressão osmótica

Segundo Madigan *et al*, (2004), a água é o solvente da vida. Todos os organismos necessitam de água e a disponibilidade desta é um fator importante que a natureza disponibiliza e determinante para o crescimento dos microrganismos, sendo que a sua composição é de 80 a 90 % de água. Os microrganismos obtêm a maioria dos seus nutrientes da água presente no meio ambiente.

A pressão osmótica é a força com a qual a água se move, através da membrana citoplasmática, de uma solução, contendo uma baixa concentração de substâncias dissolvidas (solutos) para outra contendo alta concentração de solutos. Quando as células microbianas estão em meio aquoso não devem existir grandes diferenças na concentração dentro e fora da célula, pois as células poderiam desidratar-se ou romper-se (Teixeira de Carvalho, I., 2010).

Numa solução isotônica o fluxo de água para dentro e fora da célula está em equilíbrio e a célula cresce naturalmente. Entretanto, quando o meio externo é hipertônico, com uma concentração de soluto mais alta que o citoplasma da célula, a célula perde água e o seu crescimento é inibido. Ao contrário, quando a solução externa é muito hipotônica, com uma concentração de solutos muito mais baixa do que na célula, a água flui para dentro da célula e rompe (Teixeira de Carvalho, I., 2010).

A disponibilidade de água expressa-se em termos físicos como a atividade de água ( $a_w$ ), que significa o quociente entre a pressão de vapor do ar em equilíbrio com uma substância em

solução e a pressão de vapor de água pura para a mesma temperatura. Os valores de  $a_w$  variam entre 0 e 1 e alguns valores representativos das espécies bacterianas são mencionados na **Tabela 5** (Madigan *et al*, 2004).

**Tabela 5** - Valores mínimos de atividade de água ( $a_w$ ) para multiplicação de alguns microrganismos

Organismos	$a_w$
Bactérias deteriorantes	0,90
Leveduras deteriorantes	0,88
Bactérias halofílicas	0,75
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,97
<i>Escherichia coli</i>	0,96
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,95
<i>Candida utilis</i>	0,94
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,94
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,93
<i>Candida scottii</i>	0,92

A atividade de água ( $a_w$ ) é definida como a relação existente entre a pressão de vapor de uma solução ou de um alimento (P) com relação à pressão de vapor de água pura ( $P_o$ ), à mesma temperatura:  $a_w = P / P_o$ . Portanto a água presente nos alimentos exerce uma pressão de vapor que depende da quantidade e da concentração de soluto na água e da temperatura (Gava *et al*, 2008).

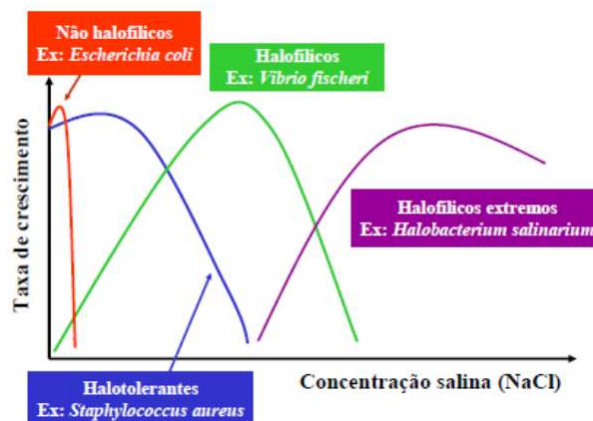
O termo  $a_w$  indica a intensidade das forças que unem a água com outros componentes não aquosos e, conseqüentemente, a água disponível para o crescimento dos microrganismos e para que possam realizar diferentes reações químicas e bioquímicas. Quando se adiciona um soluto à água pura, as moléculas de água orientam-se na superfície do soluto e inter-relacionam-se com ele. Como consequência, diminui o ponto de congelação, aumenta o ponto de ebulição e reduz-se a pressão de vapor, segundo a Lei de Raoult, que diz: “A diminuição relativa de pressão de vapor de um líquido ao dissolver-se num soluto é igual à fração molar do solvente” (Gava *et al*, 2008).

Existem alguns microrganismos que são particularmente resistentes a baixa  $a_w$ , como por exemplo, os osmofílicos e os halofílicos (**Figura 14**). Os microrganismos osmofílicos necessitam de ambientes com baixa  $a_w$  para se desenvolverem como é o caso de produtos açucarados, nomeadamente, doces, geleias, frutos em conserva, leite condensado, entre outros. Já o desenvolvimento dos halofílicos, dão-se em ambientes com elevadas concentrações salinas, por exemplo, no bacalhau seco. Na prática, tanto o açúcar como o sal são utilizados tradicionalmente na conservação de alimentos (Gava *et al*, 2008).

A maioria dos microrganismos são incapazes de existir em ambientes com atividade de água muito baixas, morrem ou desidratam e passam a um estado de latência.

De acordo com o teor de NaCl, os microrganismos podem ser classificados em:

- a) **Não halofílicos:** microrganismos não necessitam de sal para crescer e não toleram a sua presença no meio;
- b) **Halotolerantes:** não necessitam de sal para crescer, mas suportam certas quantidades no meio. O crescimento ótimo ocorre na ausência de sal;
- c) **Halófilos:** requerem certas quantidades de sal para crescer. Podem ser discretos ou moderados, necessitando de baixas concentrações de sal no meio, ou extremo, necessitando de altas concentrações de sal para crescer.



**Figura 14** - Efeito da concentração de NaCl no crescimento de microrganismos com diferentes tolerâncias ou necessidades de sal (Fonte: Madigan *et al*, 2004).

A atividade da água, temperatura e disponibilidade de nutrientes são interdependentes. Assim, a qualquer temperatura, a capacidade de os microrganismos se multiplicarem baixa quando a atividade da água baixa. Quanto mais próxima da temperatura ótima de multiplicação, mais larga é a faixa de  $a_w$ , em que o crescimento bacteriano é possível. A presença de nutrientes também é importante, pois amplia a faixa de  $a_w$  em que os microrganismos podem multiplicar-se (Teixeira de Carvalho, I., 2010).

### 3.5.3.2 Fatores químicos

#### a) Carbono

Além da água, um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano é o carbono, um macronutriente. O carbono é o esqueleto estrutural da matéria viva e é necessário para todos os compostos orgânicos que constituem uma célula viva (Tortora *et al*, 2012).

Metade do peso seco de uma célula bacteriana típica é composta de carbono. Os microrganismos quimio-heterotróficos obtêm a maior parte do seu carbono da sua fonte de energia através de materiais orgânicos como proteínas, hidratos de carbono e lípidos. Os quimioautotróficos e os fotoautotróficos obtêm o seu carbono a partir do dióxido de carbono (Tortora *et al*, 2012).

#### b) Azoto, enxofre e fósforo

Além do carbono, os microrganismos necessitam de outros elementos para sintetizar o material celular. Por exemplo, a síntese de proteínas requer quantidades consideráveis de azoto e enxofre. A síntese de (DNA) e (RNA) também requer azoto e algum fósforo, assim como para a síntese de (ATP), a molécula responsável pelo armazenamento e pela transferência de energia dentro da célula. O azoto constitui cerca de 14 % do peso seco da célula bacteriana, e o enxofre e o fósforo juntos constituem cerca de 4 % (Tortora *et al*, 2012).

Os organismos utilizam o azoto essencialmente para formar o grupo amina dos aminoácidos das proteínas. Outras bactérias utilizam o azoto dos iões amónio ( $\text{NH}_4^+$ ), que já se encontram na forma reduzida e geralmente são encontrados no material celular orgânico. Algumas bactérias, incluindo muitas das cianobactérias fotossintéticas, utilizam o azoto gasoso ( $\text{N}_2$ ) diretamente da atmosfera. Esse processo denomina-se fixação do azoto (Tortora *et al*, 2012).

O enxofre é utilizado para sintetizar os aminoácidos que contém enxofre e vitaminas como a tiamina e a biotina. Fontes naturais importantes de enxofre incluem o ião sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), o sulfureto de hidrogénio e os aminoácidos que contém enxofre (Tortora *et al*, 2012).

O fósforo é essencial para a síntese dos ácidos nucleicos e dos fosfolípidos das membranas celulares e encontra-se nas ligações de energia do ATP. Uma fonte de fósforo é o ião fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Potássio, magnésio e cálcio são também elementos que os microrganismos necessitam, frequentemente como cofatores para as reações enzimáticas (Tortora *et al*, 2012).

#### c) Elementos vestigiais

São elementos minerais em quantidades muito pequenas que os microrganismos necessitam, tais como, ferro, cobre, molibdeno e zinco. A maioria é essencial e fundamental para as funções

de certas enzimas, geralmente como cofatores. Embora esses elementos algumas vezes sejam adicionados ao meio de cultura laboratorial, costumam estar naturalmente presentes na água da torneira e em outros componentes dos meios de cultura. Mesmo que a água destilada contenha quantidades adequadas de vestígios de minerais, o uso da água de torneira algumas vezes é recomendado para confirmar que esses minerais estão presentes nos meios de cultura (Tortora *et al*, 2012).

#### **d) Potencial redox (concentração de oxigénio)**

Como os seres humanos têm necessidade absoluta de oxigénio molecular ( $O_2$ ) para viver, é perfeitamente natural que todas as formas de vida também o necessitem. No entanto, esta afirmação não é totalmente verdadeira e muitos microrganismos podem e alguns devem viver em total ausência de oxigénio. O oxigénio é pouco solúvel em água e pode consumir-se rapidamente devido às atividades respiratórias dos organismos em ambientes aquáticos e húmidos, especialmente quando existe abundância de matéria orgânica (Madigan *et al*, 2004).

O potencial redox de um meio de cultura indica-nos a capacidade de aceitar ou doar electrões, isto é, as suas características oxidantes ou redutoras. Um dos fatores que intervêm no potencial redox, ainda que não seja o único, é a concentração de oxigénio ( $O_2$ ) (Hoffmann, F. L., 2001).

O potencial redox (Eh) de um ambiente é medido em milivolts e é afetado por vários compostos, sendo o oxigénio a molécula que mais contribui para o seu aumento no alimento (Hoffmann, F.L., 2001).

A tensão ou pressão parcial do oxigénio, bem como o potencial de oxidação (poder oxidante ou redutor) do alimento determina os tipos de microrganismos que se desenvolverão. Em geral, quando um microrganismo requer um ambiente oxidativo diz-se que se desenvolve um metabolismo oxidativo, ou respiratório, enquanto que os microrganismos que requerem ambientes redutores, ou menos oxidantes, realizam um metabolismo fermentativo.

Do ponto de vista de aproveitamento do oxigénio livre, os microrganismos podem ser classificados em aeróbios, anaeróbios, microaerófilos e facultativos.

São aeróbios, quando exigem Eh positivo (+350 a +550 mV) para o seu crescimento e necessitam de oxigénio; anaeróbios quando requerem Eh negativo (+30 a -550 mV) para o seu crescimento e apenas se desenvolvem na ausência de oxigénio e facultativo quando multiplicam-se em Eh positivo e negativo (+100 a -350 mV) e podem viver em condições aeróbias ou anaeróbias. Alguns autores incluem também os microaerófilos, quando o crescimento é melhor a pressão reduzida de oxigénio, ou seja, com Eh baixo (Teixeira de Carvalho, I., 2010 e Hoffmann, F.L., 2001).

Os microrganismos aeróbios metabolizam os hidratos de carbono tendo como produto final dióxido de carbono ( $CO_2$ ), água e adenosina trifosfato (ATP), molécula altamente energética. Já os microrganismos anaeróbios não podem obter energia como no caso anterior, porque eles não possuem o sistema enzimático necessário. Assim, do ácido pirúvico, substância orgânica do

metabolismo intermediário dos glúcidos, eles podem formar ácido láctico, álcool, etc., obtendo assim energia. Comparando as reações podemos concluir que a primeira reação, energeticamente falando, é bem mais eficiente que a segunda. Isto explica porque as bactérias aeróbias, por produzirem maior quantidade de ATP, multiplicam-se mais rapidamente do que as bactérias anaeróbias (Teixeira de Carvalho, I., 2010).

Os fungos são estritamente aeróbios, as leveduras desenvolvem-se melhor em ambientes aeróbios, mas podem viver na ausência de oxigénio, enquanto que as bactérias podem ser aeróbias, anaeróbias e facultativas.

O potencial redox é um fator controlável e utilizado na conservação dos alimentos e determina os tipos de microrganismos que se irão desenvolver em determinados produtos. Pode-se, por exemplo utilizar a exaustão e embalagens impermeáveis ao oxigénio submetidas a vácuo, atmosfera com gases inertes, para controlar os microrganismos aeróbios. No caso dos enlatados, o ambiente anaeróbio favorece a multiplicação de algumas bactérias patogénicas, como o *Clostridium botulinum* (Gava *et al*, 2008).

#### **e) Fatores orgânicos de crescimento**

São substâncias precursoras de certos constituintes orgânicos da célula que o microrganismo é incapaz de sintetizar. Geralmente são necessários em pequenas quantidades e dividem-se em três classes principais:

1. Aminoácidos: participam na síntese de proteínas;
2. Purinas e pirimidinas: participam na síntese de ácidos nucleicos;
3. Vitaminas: normalmente formam a totalidade ou parte dos cofatores enzimáticos; constituem grupos prostéticos ou centros ativos de certas enzimas.

### **3.6. Meios de cultura**

As tentativas mais antigas e bem sucedidas na cultura de microrganismos em laboratório foram efetuadas por Ferdinand Cohn (1872), Jose Hroeter (1875) e Oscar Brefeld (1875). Robert Koch descreveu a sua técnica de cultura em 1881, utilizando fatias de batatas fervidas para cultivar bactérias, mas, posteriormente, desenvolveu meios artificiais de cultura tanto líquidos como sólidos. A gelatina foi inicialmente utilizada como agente solidificante nos meios de cultura de Koch, mas em 1882, Fanny Hesse, um assistente de Koch, sugeriu o uso de agar. Outro assistente de Koch, Richard Julius Petri, criou, em 1887, a placa de Petri, para ser utilizada como recipiente para meios de cultura sólidos e culturas bacterianas (Engelkirk e Duben-Engelkirk, 2012).

Os meios de cultura que são utilizados nos laboratórios de microbiologia para o cultivo de bactérias são conhecidos como meios artificiais ou meios sintéticos, pois não ocorrem naturalmente, ou seja, são preparados em laboratório (Engelkirk e Duben-Engelkirk, 2012).

O estudo microscópico das características morfológicas (dimensão, forma e tipo de associação) e das características de coloração é, geralmente insuficiente para a obtenção de uma identificação satisfatória do agente patogénico. Assim, para conhecer as propriedades fisiológicas e bioquímicas é necessário cultivar as células microbianas no laboratório.

A cultura de microrganismos consiste no crescimento de populações microbianas em meios de cultura laboratoriais. Uma cultura que tem apenas um tipo de microrganismo é conhecida por cultura pura, uma cultura que tem mais do que um tipo de microrganismo é uma cultura mista.

A cultura e o isolamento de microrganismos são duas operações básicas em Microbiologia, em que a cultura é o crescimento de populações microbianas em meios de cultura e o isolamento é a separação de um dado microrganismo a partir de culturas mistas (Ferreira e Sousa, 1998).

Com a cultura de microrganismos pretende-se:

- Aumentar a quantidade de microrganismos, que por vezes, ocorrem em número reduzido na amostra, com o objetivo de facilitar a posterior identificação;
- Procurar isolar os diferentes tipos de microrganismos existentes numa população mista;
- Diferenciar entre grupos de microrganismos através da aparência macroscópica das colónias e das reações bioquímicas com o meio;
- Caracterizar e identificar os microrganismos através das características das suas colónias, em um ou mais meios de cultura e, pelas suas capacidades de produzirem alterações químicas em diferentes meios de cultura;
- Quantificar microrganismos;
- Analisar substâncias de ocorrência natural.

Para a cultura de microrganismos é necessário existirem meios de cultura apropriados que simulem ou até melhorem as condições naturais do ambiente em que se desenvolvem. Um meio de cultura é um substrato nutritivo, sob forma assimilável capaz de permitir a nutrição e o crescimento de microrganismos (bactérias, fungos, algas, parasitas) fora do seu ambiente biológico natural, ou seja, é uma preparação de nutrientes para o crescimento de microrganismos em laboratório e que deve ser incubada a uma temperatura adequada (**Tabela 6**). Na sua formulação, deve conter também quantidade de água suficiente, pH adequado e deve ser estéril.

Os meios de cultura também podem ser classificados como líquidos ou sólidos. Os meios de cultura líquidos, também conhecidos como caldos, são acondicionados em tubos de ensaio ou balões de Erlenmeyer. Os meios sólidos (com 1,5 % de agar) fornecem uma superfície firme

onde os microrganismos crescem em colónias e semissólidos (com 0,5 % de agar) são usados para permitir a mobilidade dos microrganismos e ambos são preparados adicionando-lhes agar ao meio líquido e posterior colocação em tubos de ensaio ou placas de Petri, onde o meio solidifica. O agar é um polissacarídeo complexo obtido de uma alga marinha vermelha, a *Gelidium algae* e possui a propriedade de se fundir a uma temperatura de 96 °C e solidificar a 45 °C (Engelkirk e Duben-Engelkirk, 2012).

**Tabela 6** - Classificação dos Meios de Cultura (adaptado de Tortora *et al*, 2012).

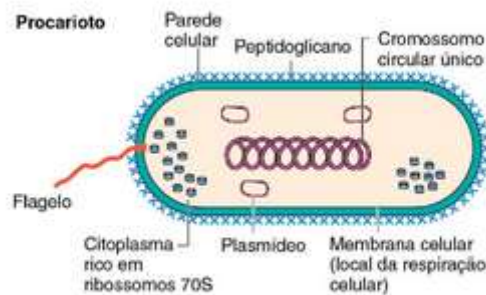
Meio de Cultura	Finalidade e características
Quimicamente definido	A composição química exata é perfeitamente conhecida. Crescimento de quimioautotróficos e fotoautotróficos. Ensaios microbiológicos.
Quimicamente complexo	A composição exata é desconhecida. Podem ter como componentes diversos ingredientes, tais como Peptonas, Extrato de Levedura, Extrato de Carne, etc. Crescimento da maioria dos microrganismos quimio-heterotróficos.
Enriquecimento	De composição química rica em nutrientes cujo objetivo é promover o crescimento dos microrganismos fastidiosos. Aumentar o número de microrganismos de interesse até níveis detetáveis
Redutor	Contém reagentes que se ligam ao oxigénio dissolvido e o eliminam do meio de cultura. É usado para o crescimento de microrganismos anaeróbios estritos.
Seletivo	Suprimem o crescimento de determinados microrganismos em benefício de outros. Favorecimento dos microrganismos de interesse.
Diferencial	Permite a distinção entre diferentes grupos de microrganismos (géneros e espécies) com base na capacidade de metabolizar componentes específicos presentes no meio de cultura e/ou na morfologia (aparência) das colónias.

### 3.7. Célula Bacteriana

As células representam a unidade estrutural e funcional de todos os seres vivos. A microscopia eletrónica divulgou nos seres vivos dois tipos de organização celular: procariota e eucariota.

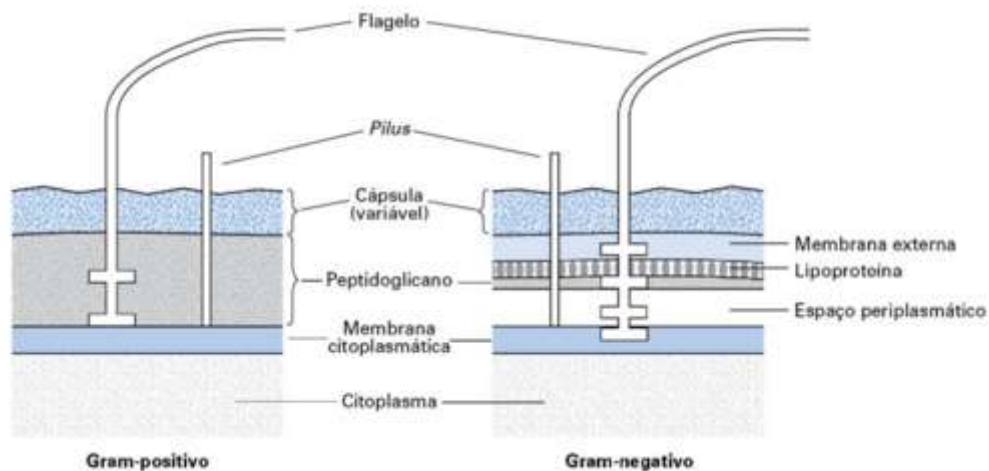
As bactérias apresentam uma estrutura relativamente simples conforme se pode observar na **Figura 15**. São organismos procariotas - organismos simples unicelulares, que não apresentam

membrana nuclear, mitocôndria, complexo de Golgi ou retículo endoplasmático - que se reproduzem por divisão assexuada (Murray *et al*, 2014).



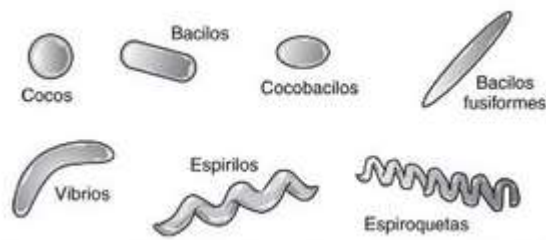
**Figura 15** - Estrutura de uma célula bacteriana  
(Fonte: Murray *et al*, 2014).

A parede bacteriana é complexa, consistindo em uma entre duas formas básicas: uma parede celular com uma camada espessa de peptidoglicano, bactérias Gram-positivas, e uma parede celular com uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa sobreposta, bactérias Gram-negativas (**Figura 16**), sendo mais complexa a parede celular das bactérias Gram-negativas do que a das Gram-positivas, tanto estrutural quanto quimicamente (Murray *et al*, 2014).



**Figura 16** - Comparação das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas  
(Fonte: Samaranyake, L., 2013).

O tamanho (1 a 20  $\mu\text{m}$  ou até maior), a forma (esferas, bastões, espirais) e o arranjo espacial (células únicas, cadeias, aglomerados) das células são utilizadas para a clarificação preliminar das bactérias, e as propriedades fenotípicas e genotípicas constituem a base para a classificação definitiva, **Figura 17** (Murray *et al*, 2014).



**Figura 17** - Formas morfológicas bacterianas

(Fonte: Murray *et al*, 2014).

A parede celular das células procariotas sempre foi uma grande vantagem para esses organismos, pois ela apresenta diversas características como elasticidade, resistência à pressão, temperaturas altas e a valores extremos de pH (Rosa, D. D., 2008). Constitui ainda o principal suporte mecânico da célula conferindo-lhe estabilidade. Além disso, atua como uma barreira física perante uma variedade de agentes potencialmente nocivos e é responsável pelas diferentes formas encontradas nas bactérias, permitindo assim explicar o comportamento diferencial das bactérias em relação à coloração de Gram.

A camada mais interna da parede celular é composta de peptidoglicano, composto que confere rigidez à parede celular, é coberta por uma membrana externa que varia em espessura e na composição química, dependendo das características da coloração pelo Gram da bactéria.

O termo “peptidoglicano” deriva de peptídeos e açúcares (glicano) que compõem a molécula (mureína e mucopeptídeo são sinónimos para peptidoglicano)

As paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam importantes diferenças químicas (Samaranayake, L., 2013):

- A camada de peptidoglicano é comum às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas é mais espessa nas Gram-positivas;
- Em contraste, os organismos Gram-negativos possuem uma membrana externa complexa composta de lipolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolipídeos. Elas formam porinas, através das quais moléculas hidrofílicas são transportadas para dentro e fora do organismo. O LPS e os seus componentes, o antígeno O e o lípido A, estão embebidos na membrana externa. O espaço periplasmático localiza-se entre a membrana externa e a membrana citoplasmática das bactérias Gram-negativas. É nesse espaço que algumas espécies bacterianas produzem enzimas que atuam em antibióticos como as penicilinas (p. ex.:  $\beta$ -lactamases);
- O LPS das bactérias Gram-negativas, que é extremamente tóxico, é chamado de endotoxina. Assim, por definição, as endotoxinas não podem ser produzidas por

bactérias Gram-positivas, porque estas não possuem LPS nas suas paredes celulares. O LPS é ligado à superfície celular e somente é libertado quando a bactéria sofre lise.

- As paredes celulares de algumas bactérias (p. ex.: *Mycobacterium tuberculosis*) contém lípidos denominados ácidos micólicos que não podem ser corados pelo Gram, por isso são chamados de ácido-resistentes, ou seja, resistem à descoloração pelo álcool-ácido após terem sido coradas pela carbolfucsina.

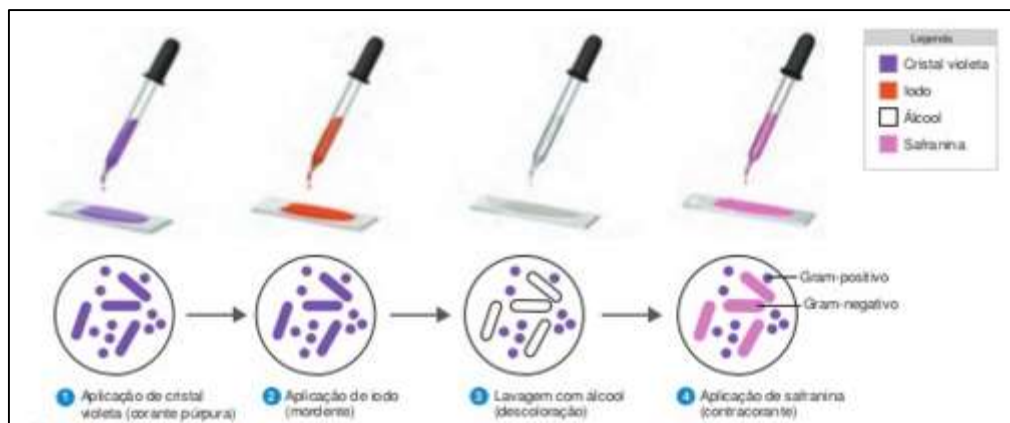
### 3.7.1. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

#### 3.7.1.1. Coloração diferencial de Gram

Na microbiologia, as bactérias podem ser classificadas em dois subgrupos principais de acordo com as características das suas paredes celulares. A coloração denominada de Gram, desenvolvida pelo médico dinamarquês Christian Gram em 1884, divide as bactérias em Gram-positivas (violeta) e Gram-negativas (vermelho) (Samaranayake, L., 2013).

Em termos genéricos, o processo da coloração diferencial de Gram (**Figura 18**) consiste em:

1. Sujeitar um esfregaço fixado com cristal violeta à coloração;
2. Aplicar iodo como mordente;
3. Descorar a coloração primária com álcool-acetona e contrastar com o corante safranina.



**Figura 18** - Procedimento geral e respetiva morfologia da coloração diferencial de Gram (Fonte: Tortora *et al*, 2012).

Inicialmente verifica-se a formação de um complexo de cristal violeta-iodo no protoplasto (não na parede da célula) de todos os organismos sujeitos à coloração por este processo. Os

organismos que conseguem reter este complexo corado após a descoloração são classificados como Gram-positivos, enquanto os que podem ser descorados e contrastados são classificados como Gram-negativos.

Após perturbação ou remoção da parede da célula, o protoplasto das células Gram-positivas e também das Gram-negativas pode ser descorado e o atributo Gram-positivo perde-se. Assim, o mecanismo da coloração de Gram parece estar relacionado com a presença de uma parede celular intacta capaz de atuar como uma barreira à descoloração da coloração primária.

Em geral, a parede da célula é permeável e não seletiva. Segundo certas teorias, durante o processo de coloração Gram, a parede das células Gram-positivas é desidratada pelo álcool existente no descorante e perde permeabilidade, retendo assim a coloração primária.

No entanto, a parede das células Gram-negativas possui um teor de lípidos superior e torna-se mais permeável quando tratada com álcool, resultando na perda de coloração primária. A base molecular da coloração de Gram ainda não foi determinada (Zimbro *et al*, 2009).

Apesar de tudo, o procedimento da coloração de Gram pode apresentar algumas limitações, tais como (Zimbro *et al*, 2009):

- Para obtenção dos melhores resultados, é aconselhável a utilização de uma cultura de 18-24 horas, uma vez que as células frescas têm uma maior afinidade para a maioria dos corantes do que as células antigas. Tal aplica-se especialmente a bactérias formadoras de esporos, que são fortemente Gram-positivas quando examinadas em culturas frescas, mas que mais tarde poderão ficar Gram-variáveis ou mesmo Gram-negativas;
- A reação da coloração de Gram é alterada pela perturbação física da parede da célula bacteriana ou protoplasto. As paredes das células das bactérias Gram-positivas interpõem uma barreira que impede a descoloração do complexo corante do citoplasma. As paredes das células Gram-negativas contêm lípidos solúveis em solventes orgânicos, que depois ficam livres para descorar o citoplasma. Assim, um microrganismo que seja fisicamente perturbado por aquecimento excessivo não irá reagir à coloração de Gram conforme previsto;
- Os resultados da coloração de Gram, incluindo a morfologia dos organismos, podem ser afetados pela idade do isolado, por bactérias que contenham sistemas enzimáticos autolíticos e culturas transferidas de meios que contenham antibióticos;
- A coloração Gram-positiva precipitada pode gerar formas cocóides irregulares ou asteres que se assemelham a hifas fúngicas.

O grau com que o organismo retém a coloração depende da sua estrutura, das condições de cultura e da habilidade do microscopista na elaboração do esfregaço.

Existem também erros do operador no procedimento da coloração de Gram que podem surgir, dependendo do método e da técnica utilizada e que poderia resultar num organismo Gram-positivo e adquirir a coloração de Gram-negativo. Eles incluem, segundo a Public Health England (2015):

- Preparação demasiado densa do esfregaço;
- Calor excessivo durante a fixação que poderá provocar a destruição da morfologia celular;
- Baixa concentração do corante cristal violeta;
- Lavagem excessiva entre as etapas do processo de coloração. Isto pode fazer com que o passo do violeta de cristal ou o complexo corante-iodo pode ser removido das células Gram-positivas;
- Insuficiente exposição ao iodo;
- Descoloração prolongada que pode levar a um resultado idóneo onde as células Gram-positivas possam alterar da cor rosa ao vermelho indicando um resultado Gram-negativo. Uma descoloração deficiente pode levar a um resultado erróneo onde as células Gram-negativas podem aparecer de azul a roxo indicando um resultado Gram-positivo. O grau de descoloração necessário é determinado pela espessura do esfregaço.

# Capítulo 4

## 4. Fundamentos práticos

### 4.1. Amostragem

O controlo da qualidade da água inicia-se com a colheita da amostra. Esta operação exige o maior cuidado possível, pois os resultados analíticos, e posteriormente a sua interpretação, podem ser afetados pelo modo como é realizada. Para que um estudo de qualidade da água seja bem sucedido é fundamental desenvolver e seguir técnicas de amostragem adequadas para que a amostra seja representativa, no que diz respeito à colheita de amostras, as metodologias adotadas pelo laboratório são baseadas na norma ISO 19458 e na recomendação ERSAR n.º 03/2010 (ERSAR, 2010).

O objetivo de uma amostragem é recolher um volume muito pequeno de uma água e que represente o mais detalhadamente possível, as espécies, a sua dispersão e número de microrganismos que deve ser representativo de todo o sistema de água de onde foi colhida. Tem por finalidade fornecer informações sobre as características microbiológicas das águas que vão ajudar a avaliar a existência de perigo ou não para a saúde pública (Machado *et al*, 1998).

Para o cumprimento dos requisitos legais dispostos no Decreto-lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, relativo ao regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, deverá ser efetuada a verificação da qualidade da água destinada ao consumo humano, na torneira do consumidor, através de controlos analíticos periódicos definidos num programa de controlo da qualidade da água (ERSAR, 2010).

### 4.2. Processo de colheita da amostra de água para análise microbiológica

A amostra de água deve ser colhida obedecendo aos cuidados de assepsia, deve ter volume suficiente para permitir, se necessário, a repetição dos testes. O recipiente para a colheita da amostra deve permanecer fechado até ao momento da colheita; nessa altura enche-se sem enxaguar com a água a analisar e fecha-se imediatamente, tendo cuidado para não contaminar a superfície interior da tampa. O frasco não deve ficar completamente cheio, pois algum espaço vazio no seu interior facilitará a agitação e mistura da amostra antes de se efetuarem as análises (Abelho, M., 2012).

As mãos e a roupa dos intervenientes na colheita devem estar limpas. Os recipientes devem ser de material transparente e incolor (vidro, polietileno ou polipropileno) e estar esterilizados mediante esterilização em autoclave (mínimo de quinze minutos a 121 °C), esterilização a seco (mínimo uma hora a 160-170 °C) ou ser constituídos por recipientes irradiados recebidos diretamente do fabricante. As amostras devem ser claramente identificadas com tinta indelével no recipiente e no formulário relativo à amostra (Abelho, M., 2012). Estes frascos devem conter tiosulfato de sódio (para neutralizar o cloro da amostra), na concentração de 10 a 12 mg / 500 ml.

Após a colheita, as amostras de água devem, em todas as fases do transporte, ser protegidas da exposição à luz, em especial à luz direta do sol e devem ser mantidas a uma temperatura de cerca de 4 °C e entregues no laboratório o mais rápido possível, idealmente no próprio dia da colheita para se efetuar o seu processamento.

### **1. Ações a efetuar no momento da colheita:**

Antes da colheita de água para análise microbiológica deve-se:

- Recolher uma amostra para determinação imediata, no local, do teor em cloro residual livre;
- Preencher a ficha de identificação da colheita.

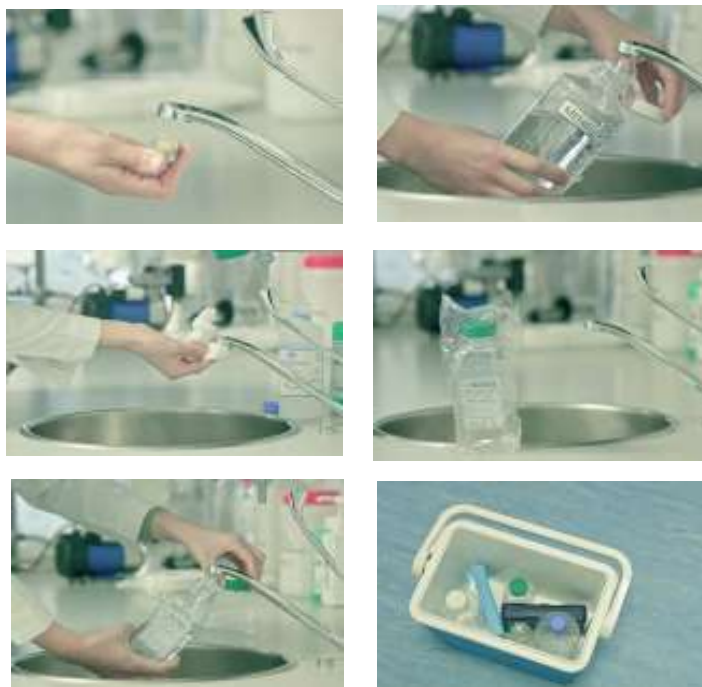
### **2. Técnica de colheita:**

- Estabelece-se um grau de prioridade em cada ponto de amostragem:
  - 1.<sup>a</sup> escolha: torneiras de cozinhas;
  - 2.<sup>a</sup> escolha: torneiras de balcão de estabelecimentos comerciais;
  - 3.<sup>a</sup> escolha: torneiras de lavatórios de instalações sanitárias.

### **3. Procedimentos a efetuar durante a recolha de amostras de água de uma torneira para análise microbiológica (Figura 19):**

- Avaliar visualmente o estado da torneira escolhido previamente como ponto de amostragem. A torneira deve estar em condições normais de conservação e higiene, não levantando dúvidas sobre a sua utilização;
- Deve-se escolher uma torneira de água fria;
- Retirar se possível, os acessórios externos e adaptados à torneira (mangueiras, filtros ou outras aplicações);

- Desinfetar a torneira com álcool a 70 %. Limpar com algodão embebido em álcool, a boca da torneira, o exterior e o máximo do interior possível. Em seguida mergulhar a boca da torneira, em álcool a 70 %, durante dois a três minutos;
- Abrir a torneira e deixar correr a água com fluxo máximo, durante cinco a dez segundos;
- Reduzir o fluxo e deixar correr a água o tempo suficiente para eliminar a influência do desinfetante e para que se esgote a água que tenha estado parada na canalização;
- Sem fechar a torneira, calçar luvas estéreis ou desinfetar as mãos com álcool a 70 %;
- Abrir o frasco de colheita esterilizado só neste momento e colher a água mantendo-o inclinado para evitar a sua contaminação pelo ar. Manter a tampa na mão esquerda virada para baixo e nunca tocar no interior da tampa ou no gargalo do frasco;
- Recolher a amostra de água mantendo o frasco inclinado sem encher completamente;
- Fechar imediatamente o frasco e homogeneizar a amostra após efetuar a recolha;
- Colocar os frascos das amostras em malas térmicas devidamente limpas e com acumuladores de frio, de modo a garantir a correta refrigeração das amostras, até à entrega no laboratório. A quantidade de acumuladores de frio dependerá da duração do percurso até ao laboratório e da temperatura ambiente.



**Figura 19** - Procedimento para colheita de uma amostra de água para consumo humano  
 (Fonte: Departamento de Saúde Pública e Planeamento - Laboratório de Saúde Pública.  
 ARS Alentejo, 2012).

Todas as amostras devem ser enviadas devidamente identificadas:

- Nome/número do requisitante;
- Ponto de amostragem e parâmetros a analisar;
- Data, hora temperatura da colheita e temperatura à chegada;
- Identificação do técnico responsável pela colheita;
- Fazer-se acompanhar pela respetiva Guia de Recolha de Amostra.

### 4.3. Meios de cultura

Os meios de cultura disponibilizam aos microrganismos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e multiplicação. Cada grupo de microrganismos possui necessidades nutricionais específicas, como tal, os meios de cultura são escolhidos de modo a satisfazer essas necessidades.

A incubação dos meios de cultura, após a inoculação da amostra de água, permite o desenvolvimento dos microrganismos com formação de colónias típicas, no caso de meios sólidos, o que facilita a identificação dos mesmos.

Neste estudo os meios de cultura utilizados para a enumeração e identificação dos microrganismos pesquisados, foram escolhidos e selecionados de acordo com as normas mais recentes e em vigor, e estão descritos na **Tabela 7**:

**Tabela 7** - Meios de cultura utilizados para a identificação e enumeração dos microrganismos

Microrganismo	Meio de cultura seletivo	Meio de cultura confirmativo	Meio de cultura não seletivo
Coliformes Totais	m- ENDO Agar LES		
<i>Escherichia coli</i>	m-FC Agar		
Enterococos	<i>Slanetz and Bartley</i> Agar	Bílis Esculina Azida Agar	
<i>Clostridium perfringens</i>	m-CP Agar		
Contagem de microrganismos a 22 °C e 36 °C			Plate Count Agar (PCA)

Para a realização das diferentes metodologias foram usados meios de cultura na sua forma desidratada. A reconstituição dos mesmos foi realizada no Laboratório de Microbiologia,

segundo as instruções do fabricante. O único meio de cultura que é adquirido em placa de Petri já pronto a utilizar é o m-CP (membrane *Clostridium Perfringens*) (Liofilchem®, refª 163612).

#### 4.4. Provas Bioquímicas

Cada espécie bacteriana possui um perfil bioquímico característico para a sua identificação. Há testes que permitem comprovar e verificar bioquimicamente certas espécies e as suas características, uma vez que se baseiam nas respostas metabólicas que apresentam consoante o meio. Esses testes são as Provas Bioquímicas que consistem em processos de identificação e caracterização de microrganismos isolados. Os testes mais importantes são aqueles que dizem respeito ao metabolismo da bactéria e, que na grande maioria das vezes estão relacionados com a presença de enzimas específicas. Assim, neste trabalho, efetuou-se dois estudos sobre:

1. Identificação de enzimas respiratórias: Teste da oxidase.
2. Metabolismo proteico e enzimas: Prova de produção de indol.

##### a) Teste da Oxidase

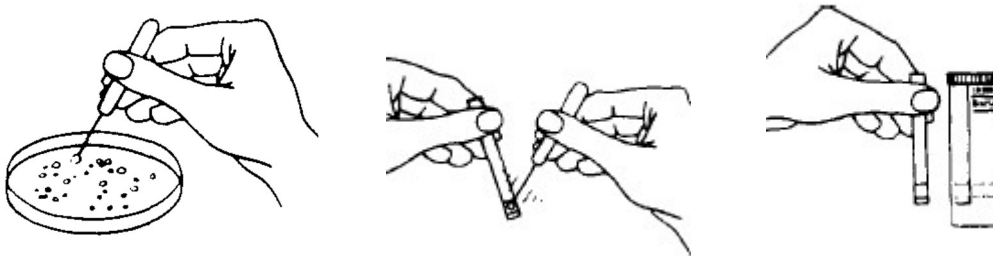
O teste da oxidase é um procedimento qualitativo para determinar a presença ou ausência de atividade de oxidase, no citocromo C, das bactérias. O citocromo oxidase é uma enzima do grupo da porfirina férrica muito difundida na natureza. Esta enzima oxida o citocromo C reduzido e transforma-se nela mesma na forma reduzida e inativa. Por transferência de elétrons com a formação de oxigénio molecular (oxidação do oxigénio da água ou da água oxigenada), o citocromo oxidase transforma-se de novo na forma ativa. Na presença de oxigénio molecular o sistema citocromo oxidase / citocromo C pode reduzir uma série de substâncias orgânicas, entre elas, o reagente NaDi (1-naftol + dimetilparafenilendiamina) com a formação da molécula de condensação, azul de indofenol.

Os organismos que possuem o citocromo C como parte da sua cadeia respiratória são positivos para a oxidase e o reagente adquire a cor púrpura. Os organismos que não possuam o citocromo C como parte da sua cadeia respiratória não oxidam o reagente, deixando-o incolor dentro do limite de tempo do teste e, por isso, são negativos para a oxidase.

O teste da oxidase permite diferenciar, dentro das bactérias, as que pertencem à família *Enterobacteriaceae* (oxidase negativa) daquelas que pertencem à família não *Enterobacteriaceae* (oxidase positiva).

O procedimento de colheita e preparação das amostras é o seguinte:

- Obter o organismo para o teste numa cultura de isolamento primária espalhada num meio sólido apropriado;
- Selecionar as colónias que estiverem bem isoladas;
- Com a ajuda de uma ansa de inoculação retirar do meio de cultura uma colónia bem isolada e que apresente um ótimo crescimento;
- Aplicar a colónia sobre a zona de reação da vareta indicadora e esfregar com a ansa de inoculação;
- Ao fim de aproximadamente 20 a 60 segundos, comparar o resultado na escala colorimétrica.



**Figura 20** - Procedimento para a determinação da oxidase usando o método de tira e escala colorimétrica (Fonte: Merck, 2000).

Os organismos positivos para a oxidase produzem uma coloração escura ou púrpura ao fim de 20 segundos.

Para a obtenção de melhores resultados e evitar os falso-positivos deve-se utilizar exclusivamente ansas de platina.

O controlo de qualidade para o teste da oxidase é efetuado com os microrganismos referidos na seguinte **Tabela 8**.

**Tabela 8** - Controlo de qualidade para o teste da oxidase (Adaptado de Zimbro *et al*, 2009)

Organismo	ATCC®	Reação à oxidase	Resposta de cor
<i>Escherichia coli</i>	25922	Negativa (-)	Incolor (sem alteração a cinzento)
<i>Neisseria sicca</i>	9913	Positiva (+)	Púrpura escuro
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Positiva (+)	Púrpura escuro

No entanto, o teste da oxidase apresenta algumas limitações (Zimbro *et al*, 2009):

- Testa a identificação presumível da *Neisseria* e a diferenciação e identificação de bacilos Gram-negativos. Examinar todos os outros organismos positivos para a oxidase através da coloração de Gram para determinar a morfologia celular e a reação Gram;
- Determina as reações de oxidase dos bacilos Gram-negativos em colônias obtidas a partir de meios não seletivos e não diferenciais, para garantir resultados válidos;
- A *Pseudomonas aeruginosa* quando apresenta uma consistência mucoide podem necessitar de mais 10 a 20 segundos para apresentarem positividade;
- Os meios de cultura que contém níveis elevados de glucose podem inibir a atividade da oxidase, provocando reações falso-negativas à oxidase.

#### b) Prova de indol de Kovacs

O teste de indol baseia-se num procedimento qualitativo com o objetivo de determinar a capacidade que a bactéria tem em produzir indol por meio de desaminação redutiva do triptofano, ou seja, determina a capacidade de um microrganismo para dividir indol a partir do triptofano. O triptofano é um aminoácido que pode ser oxidado por certas bactérias para formar três metabolitos indólicos principais: indol, escatol (metil indol) e ácido indolacético (IAA).

As diversas enzimas intracelulares envolvidas denominam-se coletivamente “triptofanase”, um termo geralmente usado para designar um sistema completo de enzimas que medeiam a produção de indol pela atividade hidrolítica sobre o substrato triptofano. O principal intermediário da degradação do triptofano é o ácido indolpirúvico, que a partir do qual se pode formar indol por desaminação e escatol por descarboxilação do ácido indoloacético (IAA) (MacFaddin, J.F., 2003).

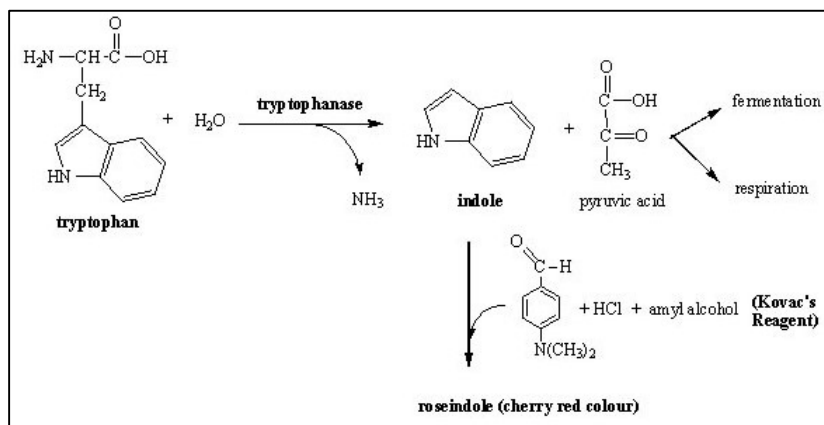
Existem dois tipos de desaminação: a oxidativa e a redutora. A desaminação oxidativa separa o grupo  $\text{NH}_2$  de um aminoácido e adiciona uma ligação dupla ao produto desaminado (um composto não saturado) e de  $\text{NH}_3$  e energia (MacFaddin, J.F., 2003).

A desaminação do triptofano é redutiva, ou seja, o grupo amina  $\text{NH}_2$  é separado e libertado como  $\text{NH}_3$  e energia, que é utilizada pela bactéria. A degradação do triptofano liberta indol, ácido pirúvico, amoníaco e energia.

O indol libertado da molécula de triptofano pode ser detetada por meio de um reagente que engloba uma combinação química que produz uma cor definida.

A presença ou ausência da formação de indol utiliza-se para a identificação bacteriana e pode ser detetada adicionando o reagente de Kovacs, que ao reagir com o indol forma na superfície do meio um composto vermelho, não solúvel em água.

O reagente de Kovacs é um reagente bioquímico composto por álcool isoamílico, *para*-dimetilaminobenzaldeído e ácido clorídrico concentrado. O indol produzido gera um complexo vermelho com o *p*-dimetilaminobenzaldeído, conforme se pode observar na **Figura 21**.



**Figura 21** - Mecanismo da reação do reagente de Kovacs (Fonte: <https://sites.google.com/site/scientiaestpotentiaplus/reagente-de-kovac>).

A produção de indol, a partir do triptofano, pode então ser detetada cultivando os microrganismos a analisar num meio rico no aminoácido, a triptona (digerido pancreático de caseína) que é constituído por inúmeros polipeptídeos que contêm muitos resíduos de triptofano.

O aparecimento de um anel vermelho à superfície do meio líquido no prazo de 30 segundos, indica uma reação positiva para a produção de indol. Uma cor amarela indica um resultado negativo.

A **Tabela 9** enumera os microrganismos utilizados para o controlo de qualidade de rotina na prova de indol:

**Tabela 9** - Controlo de qualidade utilizado na prova de indol de Kovacs (Adaptado de MacFaddin, J.F., 2003)

Organismo	ATCC®	Reação
<i>Escherichia coli</i>	25922	Positivo (+)
<i>Enterobacter cloacae</i>	23355	Negativo (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Negativo (-)
<i>Proteus mirabilis</i>	14153	Negativo (-)

O método apresenta no entanto algumas limitações (Public Health England, 2014):

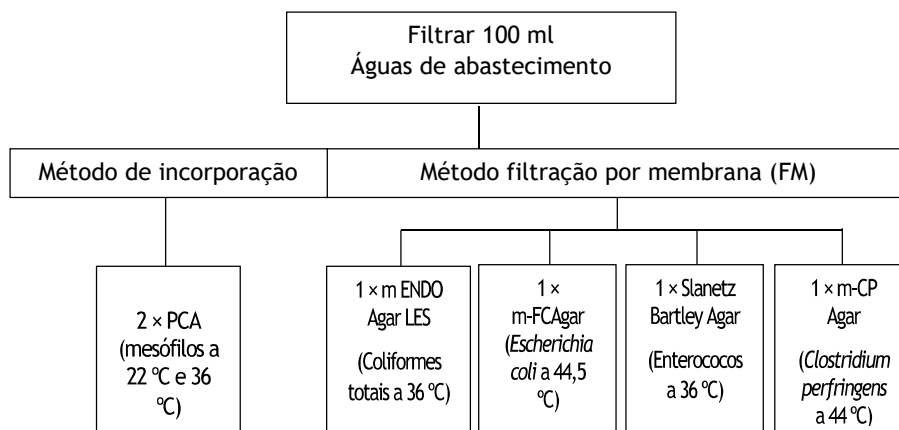
- Se o meio de cultura a utilizar é a peptona em vez do caldo de triptofano, o lote deve ser verificado com um controlo positivo para assegurar se a peptona utilizada é a adequada para a produção de indol. Isto poderá ocorrer porque existem no mercado diversas variedades de meios de cultura e alguns são inadequados para a produção de indol, pois contém na sua formulação muito pouco triptofano;
- Meios de peptona com glucose adicionada não devem ser utilizados, porque a produção de ácido pode inibir a produção de indol, devido a alteração no valor de pH que deve ser 4,0;
- O índole é um produto difusível. Para evitar a difusão, deve-se selecionar uma colónia bem isolada para efetuar a prova;
- O reagente de Ehrlich, uma alternativa ao reagente de Kovacs, contém *p*-dimetilamino-benzaldeído (DMAB) que reage com o indol para produzir um produto vermelho. A formulação do reagente de Ehrlich é mais sensível, mas contém solventes adicionais, tóxicos ou inflamáveis. O reagente de Kovacs é mais estável e a ausência de solventes orgânicos adicionais, necessários com o reagente de Ehrlich, faz com que o reagente de Kovacs seja mais adequado para uso em laboratórios.

#### **4.5. Métodos de análise microbiológica da água**

A análise microbiológica permite uma indicação sensível, mas não a mais rápida, da contaminação dos sistemas de abastecimento de água para consumo humano. Fatores como o meio de crescimento e as condições de incubação, natureza e tempo de recolha ou armazenamento da água podem influenciar as espécies isoladas e a sua contagem.

Na generalidade, para a deteção e quantificação dos microrganismos presentes em amostras de água para consumo humano, o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Química adotou o método de filtração por membrana (FM), seguido de incubação em meio seletivo (dependendo do microrganismo) e confirmação por testes bioquímicos.

A sementeira das águas de abastecimento faz-se de acordo com o seguinte esquema:



**Figura 22** - Sementeira de amostras de água de abastecimento público

As análises são realizadas em conformidade com as normas em vigor (nacionais e/ou internacionais): Normas Portuguesas (NP), Normas Europeias de “European Committee for Standardization” (EN), Normas Internacionais do “International Organization for Standardization” (ISO) e Normas Americanas “Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater” (AWWA, APHA e WEF) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Métodos de ensaios para a determinação dos parâmetros microbiológicos por filtração em membrana

Parâmetro	Método de ensaio	Anexo
Bactérias coliformes	SM 9222 B	B4
<i>Escherichia coli</i>	SM 9222 D	B5
Enterococos	ISO 7899-2:2000	B2
<i>Clostridium perfringens</i>	Diretiva 98/83/EC	B3

A legislação em vigor recomenda que os métodos utilizados para a análise da qualidade da água para consumo humano garantam que os resultados sejam fiáveis e comparáveis. O laboratório para garantir estes pressupostos tem de demonstrar que o método e o controlo de qualidade aplicados são eficientes. Uma forma de garantir que esse método é adequado, é utilizar métodos ou normas nacionais ou internacionais.

### 4.5.1. Método de filtração por membrana - pesquisa e quantificação

O princípio deste método baseia-se na concentração de microrganismos a partir de amostras relativamente grandes na superfície do filtro de membrana e na cultura desses microrganismos num meio de cultura sólido, seletivo e diferencial (Sartorius, 2014).

A técnica de filtração por membrana (FM) consiste na filtração de um volume de amostra de água (100 ml) através de uma membrana filtrante de éster de celulose, com porosidade 0,45 µm, que retém as bactérias. Por aplicação de vácuo, a água passa pela membrana ficando assim retidas as bactérias na respetiva membrana, que é posteriormente transferida diretamente para os meios de cultura seletivos e diferenciais.

Após a incubação à temperatura adequada as colónias típicas são contadas e transferidas para um meio de cultura confirmativo. É então feita uma avaliação de reações típicas dos microrganismos por testes bioquímicos, serológicos ou enzimáticos e também a coloração de Gram.

O protocolo de utilização a seguir na técnica da filtração por membrana é o seguinte, de acordo com a **Figura 23 (a), (b), (c), (d) e (e)**.



**(a)** Flamejar a superfície do suporte durante 3 a 5 segundos. Retirar uma membrana filtrante do invólucro estéril e com a ajuda de uma pinça previamente flamejada, colocar a membrana centrada no suporte.

**(b)** Colocar um copo de filtração de 100 ml tendo o cuidado de não tocar no seu interior. Pressionar em relação ao suporte até notar um “clíc”.

**(c)** Verter a amostra no copo e de seguida aplicar vácuo com a ajuda da bomba elétrica de vácuo até que o líquido seja totalmente filtrado.



**(d)** Fechar a válvula de vácuo. Retirar o copo e pressionar o manípulo situado na coluna vertical do suporte, com o objetivo de levantar a membrana. Com a ajuda de uma pinça flamejada, retirar a membrana do suporte.



**(e)** Colocar a membrana efetuando um movimento “ondulado”, com a quadricula virada para cima dentro de uma caixa de Petri (com meio gelosado). Evitar a retenção de borbulhas de ar debaixo da membrana. Incubar a placa de Petri de acordo com as condições previstas.

**Figura 23** - Sequência operativa da técnica de filtração por membrana (adaptado de: [www.emdmillipore.com/biomonitring](http://www.emdmillipore.com/biomonitring)).

Como qualquer técnica, o método de filtração por membrana apresenta vantagens e inconvenientes:

Vantagens do método:

- Enumeração direta do número de microrganismos com elevada precisão e exatidão;
- Formação de uma colónia visível a partir de um microrganismo permitindo o seu isolamento para posterior caracterização e identificação;
- Possibilidade de processar grandes volumes de amostra aumentando a sensibilidade do método.

O método apresenta algumas desvantagens, entre elas:

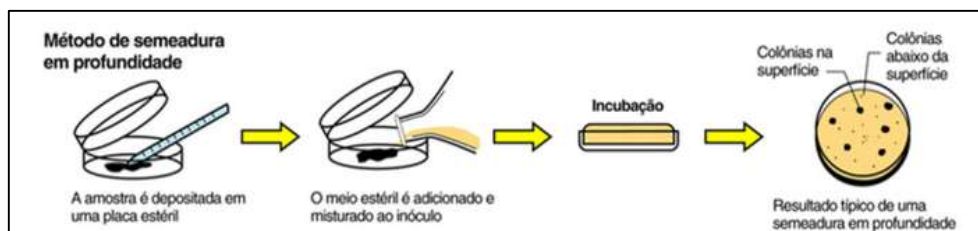
- Não se pode aplicar a amostras de águas turvas com baixa concentração microbiana, cuja matéria em suspensão pode obstruir a membrana ou impedir o crescimento dos microrganismos alvo;
- Possibilidade de não recuperação dos microrganismos que se encontram sob stresse ou enfraquecidos;
- Resultados falsos negativos devido à incapacidade de alguns microrganismos viáveis presentes em águas naturais crescerem;
- Resultado falso positivos quando microrganismos não alvo formam colónias semelhantes às colónias alvo.

O método da filtração por membrana é o mais utilizado, porém, revela-se muito trabalhoso quando é necessário efetuar muitas diluições da amostra.

Os resultados aqui obtidos são expressos em Unidades Formadoras de Colónias (UFC/100 ml) de amostra. Esta técnica é usada e aplicada a todas as amostras estudadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

#### **4.5.2. Método por incorporação**

No método por incorporação o inóculo pode ser realizado com um volume de 1 ml da amostra diretamente na placa de Petri. O meio de cultura mantido em banho-maria a  $\pm 50$  °C, para impedir a solidificação do agar, é vertido sobre a amostra, que será misturada por agitação suave da placa. Após solidificação do agar, a placa é incubada na temperatura de crescimento dos microrganismos em questão. Nesse método o crescimento das colónias ocorre dentro do meio de cultura e na superfície. Após incubação, contaram-se as colónias que se desenvolveram dentro e na superfície do meio.



**Figura 24** - Procedimento do método por incorporação

Desvantagens do método por incorporação:

- Microrganismos sensíveis ao calor podem ser danificados pelo agar fundido (líquido a  $\pm 50$  °C) e podem ficar impossibilitadas de formar colônias.

**Tabela 11** - Métodos de ensaio para determinação dos parâmetros microbiológicos por incorporação

Parâmetro	Método de ensaio	Anexo
Contagem de microrganismos a 22 °C	ISO 6222:1999	B1
Contagem de microrganismos a 36 °C	ISO 6222:1999	B1

## 4.6. Métodos analíticos de referência

A avaliação de parâmetros microbiológicos permite verificar eventuais contaminações microbiológicas. A sua existência indica que poderão estar presentes microrganismos causadores de doenças patogênicas, responsáveis por eventuais perigos para a saúde pública.

### 4.6.1. Enumeração de microrganismos viáveis - número de colônias a 22 °C e 36 °C - ISO 6222:1999

O método consiste na enumeração de microrganismos cultiváveis, por contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em meio *Plate Count Agar* (PCA) (Merck®, ref<sup>a</sup> 1.05463) após incubação aeróbia a 22 °C e 36 °C, em águas destinadas ao consumo humano (Abelho, M., 2012).

O meio de cultura utilizado é o *Plate Count Agar* (PCA) porque fornece aminoácidos a partir da digestão enzimática da caseína, extrato de levedura que fornece principalmente vitaminas do complexo B e outras substâncias nitrogenadas complexas necessárias para o crescimento de uma grande variedade de microrganismos, além de ser uma fonte de energia por possuir dextrose na sua composição (Zimbro *et al*, 2009).

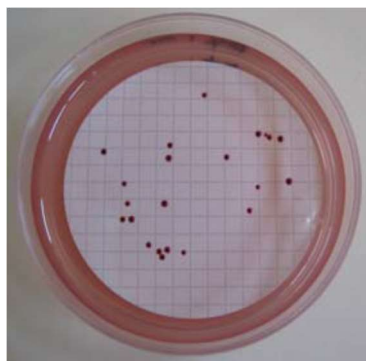
O procedimento a efetuar para a execução deste método, é o seguinte:

- Incorporar um inóculo de 1 ml de amostra em caixas de Petri estéreis de 90 mm de diâmetro;
- Adicionar o meio de cultura liquefeito a uma temperatura de  $\pm 50$  °C;
- Inocular pelo menos uma placa de Petri para cada temperatura de incubação (22 °C e 36 °C);
- Deixar solidificar, inverter e incubar uma placa à temperatura de  $22$  °C  $\pm 2$  °C por um período de  $68 \pm 4$  h e a outra placa à temperatura de  $36 \pm 2$  °C por um período de  $44 \pm 4$  h;
- Observar as caixas assim que terminar o período de incubação ou armazená-las a uma temperatura de  $5 \pm 3$  °C e fazer a observação num período de 48 horas;
- Contar as colónias observadas em cada caixa de Petri (com um número contável de colónias) e calcular o número de UFC presentes num mililitro da amostra para cada temperatura de incubação;
- Se não existirem colónias nas caixas inoculadas no caso de amostra não diluída, exprimir os resultados como não detetados/ml;
- Se existirem mais de 300 colónias nas caixas inoculadas, exprimir os resultados como  $>300$ .

#### **4.6.2. Método para pesquisa e quantificação de Enterococcus - ISO 7899-2:2000**

O método consiste em filtrar a amostra previamente homogeneizada através de uma membrana estéril de ésteres de celulose de porosidade  $0,45$   $\mu\text{m}$  (Pall GN-6 Metricel® Grid 47 mm,  $0,45$   $\mu\text{m}$  S-Pack). Após a filtração da amostra, esta é colocada à superfície de uma placa de Petri com meio de cultura seletivo, sólido, *Slanetz and Bartley Agar* (Scharlau®, refª 01-178) que contém na sua formulação azida de sódio (que inibe o crescimento das bactérias Gram-negativas) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), como indicador incolor, que é reduzido a vermelho pelos enterococos. As placas de Petri são incubadas em posição invertida à temperatura de  $36 \pm 2$  °C durante  $44 \pm 4$  h (Abelho, M., 2012).

Após incubação, todas as colónias que apresentam uma coloração vermelha, castanha ou rosa, quer na parte central quer à periferia, são consideradas como presumíveis enterococos, por isso, deverão ser confirmados num número representativo, de pelo menos cinco colónias (Figura 25).



**Figura 25** - Colónias típicas em meio de cultura *Slanetz and Bartley* Agar, após incubação a  $36 \pm 2$  °C durante  $44 \pm 4$  h (Fonte: Autor).

O controlo de qualidade para uma resposta cultural típica após incubação a  $36 \pm 2$  °C no meio de cultura *Slanetz and Bartley* Agar é a seguinte (**Tabela 12**):

**Tabela 12** - Características das colónias após crescimento no meio de cultura *Slanetz and Bartley* Agar (Fonte: Zimbro *et al*, 2009)

Controlo positivo	ATCC®	Resultado esperado
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Bom crescimento, colónias de cor vermelho ou encarnadas escuro.
Controlo negativo		
<i>Escherichia coli</i>	25922	Inibido

## Confirmação

A confirmação das colónias típicas de enterococos é efetuada transferindo a membrana do meio *Slanetz and Bartley* para o meio de cultura BÍlis Esculina Azida Agar (Liofilchem®, ref<sup>a</sup> 620001) já previamente aquecido a 44 °C. A bile bovina presente no meio inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas distintas dos enterococos e a azida sódica suprime as bactérias Gram-negativas. Os enterococos e os estreptococos do grupo D quase em exclusividade hidrolisam a esculina para formar esculetina e glucose. A união da esculetina e o citrato férrico amoniacal criam um halo entre o castanho escuro e o negro em redor das colónias (MacFaddin, 2003).

Bactérias positivas para esculina são contabilizadas como pertencentes ao género *Enterococcus*, após incubação a  $44 \pm 0,5$  °C durante 2 horas (**Figura 26**).



**Figura 26** - Colónias do género *Enterococcus* em meio Bilis Esculina Azida Agar com reação positiva para a esculina a  $44 \pm 0,5$  °C durante 24 horas (Fonte: Autor).

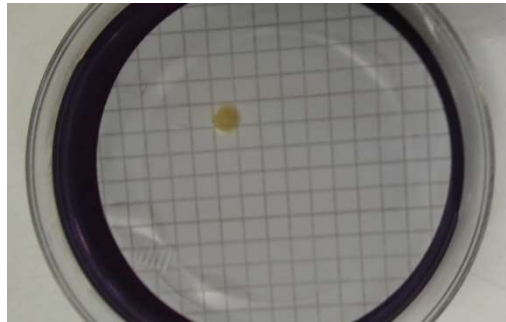
Todas as colónias características apresentam uma coloração negra circundante, o que indica uma reação positiva, o que revela a existência de *Enterococcus faecalis*.

#### **4.6.3. Método para contagem e isolamento de *Clostridium perfringens* - Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 para água de consumo humano pelo método de filtração de membrana**

Na União Europeia a utilização do meio de cultura m-CP Agar é a referência para avaliar a presença de *Clostridium perfringens* em águas para consumo humano. A pesquisa e quantificação deste microrganismo faz-se pelo método de membrana filtrante, onde se utiliza uma membrana estéril de ésteres de celulose de porosidade  $0,45 \mu\text{m}$  (Pull GN-6 Metricel® Grid 47 mm,  $0,45 \mu\text{m}$  S-Pack), sendo esse procedimento aplicado a uma amostra de água destinada ao consumo humano, e sempre que necessário, pode ser aplicado a outras amostras que não contenham partículas ou matérias em suspensão que possam interferir com a filtração. Após a filtração de 100 ml da amostra, a membrana vai ser colocada com a quadrícula voltada para cima no meio de cultura diferencial m-CP Agar (membrane *Clostridium perfringens*) (Liofilchem®, refª 163612) e incuba-se em anaerobiose durante  $21 \pm 3$  h à temperatura de  $44 \pm 0,5$  °C. Esta incubação é feita numa caixa de anaerobiose (GENbox Jarra 2,5l/bioMérieux®) onde se junta um gerador de anaerobiose (Genbox anaer/bioMérieux®) e um indicador deste ambiente (Anaer indicator/bioMérieux®). Para detetar os esporos, duplicar a amostra realizando sobre o duplicado um choque térmico durante cinco a 10 minutos a uma temperatura de 86 °C antes da incubação, com o objetivo de conseguir a germinação.

A contagem neste método realiza-se no meio de cultura m-CP Agar que na sua formulação contém D-cicloserina e polimixina B que inibe a flora acompanhante, púrpura de bromocresol que permite diferenciar as colónias de *Clostridium* que fermentam ou não a lactose e difosfato

de fenolftaleína que permite que as colónias de bactérias fosfatase positiva mudem de cor para rosa ou vermelho quando expostas a vapores de hidróxido de amónio durante 20 a 30 segundos. Em condições anaeróbias e à temperatura de  $44 \pm 0,5$  °C as colónias de *Clostridium* apresentam uma coloração amarela opaca. Desta forma, todas as colónias devem ser consideradas como colónias presumíveis de *Clostridium perfringens* (Figura 27).



**Figura 27** - Colónia característica de *Clostridium perfringens* em m-CP Agar (Fonte: Autor).

### Confirmação

Para se fazer a confirmação de *Clostridium perfringens* a partir de colónias suspeitas deve-se efetuar a contagem das colónias amarelas opacas que passam a rosa ou vermelho após exposição durante 20 a 30 segundos, a vapores de hidróxido de amónio (amoníaco) (Figura 28).



**Figura 28** - Viragem de cor das colónias de *Cl. perfringens* em m-CP Agar após exposição a vapores de hidróxido de amónio (Fonte: Autor).

Embora não esteja incluído na Normativa, deve-se realizar uma coloração de Gram de uma das colónias positivas para observação ao microscópio.

No meio de cultura m-CP Agar, as colónias típicas apresentam-se com as características seguintes, de acordo com a **Tabela 13**:

**Tabela 13** - Características das colónias típicas em m-CP Agar (Fonte: Zimbro *et al*, 2009)

Organismo	Cor típica da colónia
<i>Clostridium perfringens</i>	<b>Amarelo opaco</b> Sacarose positiva / Glucosidase negativa Cor rosa / vermelho após exposição ao NH <sub>4</sub> OH
Outros <i>Clostridium spp.</i>	<b>Azul / Verde</b> Sacarose positiva / Glucosidase positiva (ex.: <i>Cl. baratii</i> , <i>Cl. paraputrificum</i> , <i>Cl. tertium</i> )
	<b>Violeta</b> Sacarose negativa / Glucosidase positiva ou negativa (ex.: <i>Cl. biferentans</i> , <i>Cl. difficle</i> , <i>Cl. sporogenes</i> )
	<b>Amarelo opaco</b> Sacarose positiva / Glucosidase negativa permanecendo amarelo após exposição ao NH <sub>4</sub> OH

O controlo de qualidade relativo aos microrganismos usados para testar a performance do meio de cultura m-CP Agar está demonstrado na **Tabela 14**:

**Tabela 14** - Características das colónias após crescimento em m-CP Agar (Fonte: Zimbro *et al*, 2009)

Controlo positivo:	ATCC®	Resultados esperados
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	Amarelo, depois rosa / vermelho
Controlo negativo:		
<i>Escherichia coli</i>	25922	Inibido
<i>Clostridium sporogenes</i>	19404	Violeta

#### 4.6.4. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes - SM 9222 B

O método de determinação de coliformes totais pela técnica da filtração por membrana, baseia-se na filtração de um volume de amostra conhecido através de uma membrana estéril de ésteres de celulose de porosidade 0,45 µm (Pall GN-6 Metricel® Grid 47 mm, 0,45 µm S-

Pack). Após a filtração de 100 ml de amostra, a membrana filtrante é colocada cuidadosamente com a quadrícula voltada para cima no meio de cultura seletivo e diferencial m-ENDO Agar LES (membrane ENDO Agar LES) (Merck®, ref<sup>a</sup> 1.11277).

A incubação é feita à temperatura de  $36 \pm 2$  °C durante  $21 \pm 3$  h aerobicamente e colocando a placa invertida. As bactérias que fermentam rapidamente a lactose após o período de incubação produzem colónias rosa a vermelho escuro com brilho metálico. O brilho pode aparecer no centro e na periferia das colónias. Os não coliformes apresentam uma cor vermelha clara ou escura sem o brilho metálico característico (Zimbro *et al*, 2009).

Observar as membranas e contar todos os organismos que produzem colónias no meio de cultura m-ENDO Agar LES com um brilho metálico dourado esverdeado no prazo de 24 horas de incubação. As colónias descritas podem ser considerados como presumíveis colónias de coliformes (Figura 29).



**Figura 29** - Colónias características de Coliformes totais no meio de cultura m-ENDO Agar LES (Fonte: Autor).

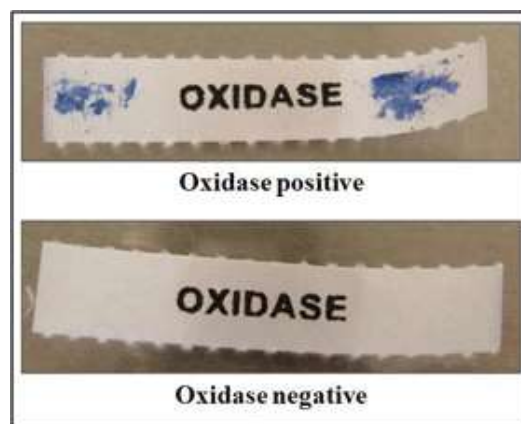
**Tabela 15** - Características das colónias após crescimento em m-ENDO Agar LES (Fonte: Zimbro *et al*, 2009)

Organismo	ATCC®	Crescimento	Cor das colónias
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bom	Vermelho com brilho metálico
<i>Salmonella typhimurim</i>	14028	Bom	Rosa
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Inibido	-

## Confirmação

Para a realização dos testes confirmatórios, nomeadamente o teste da oxidase é necessário proceder à subcultura de todas as colónias características ou de um número representativo para um meio gelosado nutritivo não seletivo, *Tryptone Soya Agar* (TSA) (Merck®, ref<sup>a</sup> 1.05458).

As colónias a confirmar em TSA vão incubar a uma temperatura de  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durante  $21\text{ h} \pm 3\text{ h}$  e proceder ao teste da Oxidase (Merck®, ref<sup>a</sup> 1.13300) (**Figura 30**). Considerar o aparecimento de cor azul-púrpura escuro em 30 segundos como teste positivo. As colónias oxidase negativa são consideradas como bactérias coliformes.



**Figura 30** - Teste da Oxidase: reação positiva e negativa em teste de tira  
(Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

### 4.6.5. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes Fecais (*Escherichia coli*) - SM 9222 D

A “*American Public Health Association*” (APHA), especifica o meio de cultura m-FC Agar (membrane Faecal Coliform Agar) (Merck®, ref<sup>a</sup> 1.11278) para os coliformes fecais (termotolerantes) com temperatura de incubação de  $44,5 \pm 0,2\text{ °C}$  utilizando a técnica por filtração em membrana.

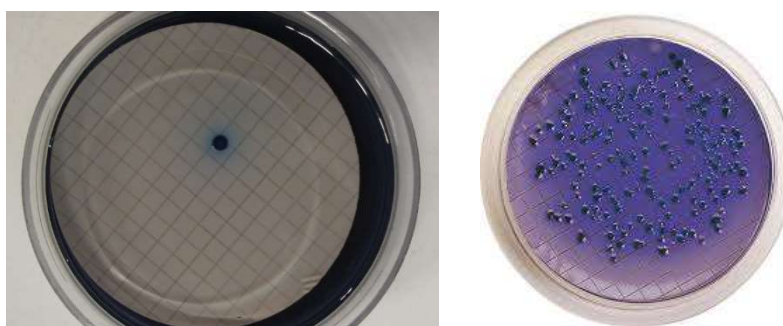
O método de determinação de coliformes totais pela técnica da filtração por membrana, baseia-se na filtração de um volume de amostra conhecido através de uma membrana estéril de ésteres de celulose de porosidade  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  (Pall GN-6 Metrical® Grid 47 mm,  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  S-Pack). Após a filtração de 100 ml de amostra, a membrana filtrante é colocada cuidadosamente com a quadrícula voltada para cima no meio de cultura seletivo e diferencial m-FC Agar.

O meio de cultura m-FC Agar contém na sua formulação agentes seletivos e diferenciais, tais como, o azul de anilina que atua como indicador de pH conferindo a coloração azul às colónias

de bactérias termotolerantes capazes de fermentar a lactose, o hidrolisado de proteínas da carne que proporcionam a fonte de azoto, a lactose, o substrato diferenciador da fermentação, o ácido rosólico que inibe a flora bacteriana geral, exceto os coliformes fecais e os sais biliares que inibem a flora Gram-positiva (Zimbro *et al*, 2009).

A incubação das amostras deve ser efetuada a uma temperatura de  $44,5 \pm 0,2$  °C durante  $21 \pm 3$  h aerobicamente. Se a incubação se realizar a 36 °C, o meio de cultura converte-se em moderadamente seletivo para isolamento, diferenciação e enumeração de Enterobactérias (Zimbro *et al*, 2009).

Após incubação, observar as membranas e contar todas as colónias que apresentem cor azul escura, que correspondem a coliformes fecais e/ou termotolerantes (**Figura 31**). As colónias de não coliformes fecais e outros organismos apresentam cor cinza a creme.



**Figura 31** - Colónia característica de coliformes fecais (*E. coli*) em m-FC Agar  
(Fonte: Autor (Esq.) e [www.bd.com](http://www.bd.com) (Dir.)).

O controlo de qualidade relativo aos microrganismos usados para testar a performance do meio de cultura m-FC Agar está demonstrado na **Tabela 16**:

**Tabela 16** - Características das colónias após crescimento no meio de cultura m-FC Agar (Fonte: Zimbro *et al*, 2009)

Organismo	ATCC®	Crescimento		Cor das colónias
		44,5 °C	36 °C	
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bom	Bom	Azul
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Inibido	Bom	Cinza
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Inibido	Bom	Cinza
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	Inibido	Inibido	-

## Confirmação

Para se efetuarem os testes confirmatórios, o teste da oxidase e a prova de indol de Kovacs é necessário proceder à subcultura de todas as colónias características ou de um número representativo (pelo menos cinco colónias) para um meio gelosado nutritivo não seletivo, *Tryptone Soya Agar* (TSA) (Merck®, refª 1.05458) à temperatura de  $36 \pm 2$  °C durante  $21 \pm 3$  h.

No teste da Oxidase (Merck®, refª 1.13300), o aparecimento de cor azul-púrpura escuro em 30 segundos, o resultado é considerado como teste positivo. As colónias oxidase negativa são consideradas como bactérias coliformes.

Para a realização da prova de indol de Kovacs (Merck®, refª 1.09293), a partir do meio de cultura TSA (Merck®, refª 1.05458), inocular em meio de cultura líquido, *Tryptophan Broth* (Scharlau®, refª 02-418) e incubar a  $44 \pm 0,5$  °C durante  $21 \pm 3$  h.

Após a incubação adicionar 3 a 5 gotas do Reagente de Kovacs (Merck®, refª 1.09293) e agitar suavemente. O aparecimento de um anel vermelho à superfície do meio líquido no prazo de 30 segundos indica uma reação positiva para a produção de indol. Uma cor amarela indica um resultado negativo (**Figura 32**).



**Figura 32** - Prova de indol de Kovacs: da esquerda para a direita - branco, negativo e positivo (Fonte: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Na **Tabela 17** estão os resultados obtidos na confirmação de e identificação de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*).

**Tabela 17** - Controlo de qualidade para o teste da oxidase e a prova de indol de Kovacs (Fonte: Zimbro *et al*, 2009)

Organismos	Teste da Oxidase	Prova de indol de Kovacs
Coliformes totais	Negativo (-)	Negativo (-)
<i>Escherichia coli</i>	Negativo (-)	Positivo (+)
Não coliformes	Positivo (+)	Não aplicável

Como resultado, classificar a *Escherichia coli* (*E. coli*) como oxidase negativa e indol positivo.



# 5. Caso prático

## 5.1. Introdução

Neste capítulo apresenta-se um exemplo prático do controlo de qualidade de uma água cuja proveniência é a mesma, apenas diferindo na presença /ausência de tratamento.

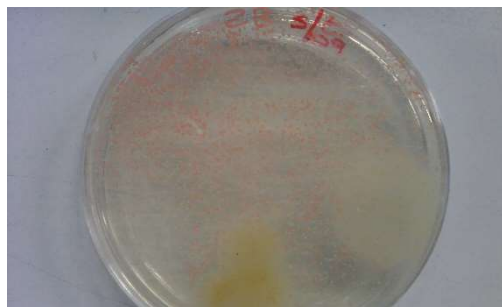
A água de abastecimento da UBI provém na sua maioria de quatro estações de tratamento de água (ETA), onde se efetua o tratamento que consiste na desinfecção por hipoclorito de sódio de modo a garantir a potabilidade da água nos diferentes pontos de abastecimento.

Para a realização deste caso prático foram efetuadas duas amostragens, ambas na ETA 1; uma primeira amostragem antes de se efetuar o processo de desinfecção e uma segunda amostragem após o processo de desinfecção, de maneira a que haja um termo de comparação nos resultados finais entre uma água sem tratamento e uma água com tratamento.

As amostragens foram efetuadas segundo os procedimentos descritos na Secção 4.2 deste relatório e ilustrado na Figura 19. A única diferença verifica-se no tipo de frasco de colheita a utilizar, enquanto que para se efetuar uma colheita de uma água tratada utiliza-se um frasco contendo tiosulfato de sódio (10 mg), para se efetuar uma colheita de uma água sem tratamento, utiliza-se um frasco de colheita denominado seco.

## 5.2. Enumeração de microrganismos viáveis - número de colónias a 22 °C e 36 °C - ISO 6222:1999

A determinação do número de colónias que se desenvolvem em meio nutritivo a 22 °C e a 36 °C, foi realizada segundo o procedimento da ISO 6222:1999. Após incubação, procedeu-se à contagem, onde se verificou que na amostra de água sem tratamento à temperatura de incubação de  $22 \pm 2$  °C, o número de colónias superava as 300/ml (**Figura 33**), enquanto que à temperatura de  $36 \pm 2$  °C não se verificou qualquer desenvolvimento de colónias. No caso da amostra de água com tratamento, tanto na temperatura de incubação a 22 °C como a 36 °C, não se verificou desenvolvimento de colónias em nenhum dos casos.



**Figura 33** - Colónias de microrganismos em meio nutritivo a 22 °C na amostra de água sem tratamento (Fonte: Autor)

**Tabela 18** - Resultados obtidos na contagem do Número de colónias a 22 °C e a 36 °C na amostra de água sem tratamento e com tratamento.

Ensaio / (Amostra de água s/ tratamento)	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
Número de colónias a 22 °C	>300	Número/ml	100 N/ml
Número de colónias a 36 °C	0	Número/ml	20 N/ml
Ensaio / (Amostra de água c/ tratamento)	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
Número de colónias a 22 °C	0	Número/ml	100 N/ml
Número de colónias a 36 °C	0	Número/mL	20 N/ml

### 5.3. Método para pesquisa e quantificação de *Enterococcus* - ISO 7899-2:2000

Para a preparação das amostras foram seguidas as instruções da ISO 7899-2:2000. Após a filtração de 100 ml de cada amostra, as membranas filtrantes foram colocadas na superfície do meio de cultura *Slanetz and Bartley Agar* (Scharlau®, ref<sup>a</sup> 01-178) e incubadas em posição invertida à temperatura de  $36 \pm 2$  °C durante  $44 \pm 4$  h. Após a incubação as placas de Petri respeitantes tanto à amostra de água sem tratamento como à amostra de água com tratamento, não se verificou desenvolvimento de qualquer colónia. A **Tabela 19** apresenta o resultado da pesquisa de bactérias coliformes nas duas amostras.

**Tabela 19** - Resultados obtidos na pesquisa e quantificação de Enterococos na amostra de água sem tratamento e com tratamento.

Ensaio / Amostra de água s/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
Enterococos	0	Número / 100 ml	0
Ensaio / Amostra de água c/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
Enterococos	0	Número / 100 ml	0

## 5.4. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes - SM 9222 B

A determinação dos coliformes totais é um fator relevante na avaliação da qualidade de uma água. A sementeira foi realizada recorrendo ao método da filtração por membrana, sendo este vulgarmente utilizado para a pesquisa, quantificação e isolamento de bactérias coliformes (APHA, 2005). O método consistiu na filtração de 100 ml de amostra, na rampa de filtração, utilizando uma membrana estéril de ésteres de celulose de porosidade 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Pall GN-6 Metrical® Grid 47 mm, 0,45 µm S-Pack).

Em seguida, as membranas foram colocadas em placas de Petri contendo meio m-ENDO Agar LES (Merck®, refª 1.11277), anteriormente preparadas, tendo o cuidado de posicionar a grelha ou quadricula virada para cima.

Incubaram-se as placas à temperatura de  $36 \pm 2$  °C durante  $21 \pm 3$  h aerobicamente e colocando a placa invertida. Após incubação, consideram-se colónias típicas todas as colónias que apresentam colónias rosa a vermelho escuro com brilho metálico. O brilho pode aparecer no centro e na periferia das colónias. Os não coliformes apresentam uma cor vermelha clara ou escura sem o brilho metálico característico.

Após incubação, as placas de Petri respeitantes tanto à amostra de água sem tratamento como à amostra de água com tratamento, não se verificou desenvolvimento de qualquer colónia. A **Tabela 20** apresenta o resultado da pesquisa de bactérias coliformes nas duas amostras.

**Tabela 20** - Resultados obtidos na pesquisa e quantificação de Bactérias coliformes na amostra de água sem tratamento e com tratamento.

Ensaio / Amostra de água s/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
Bactérias coliformes	0	Número / 100 ml	0
Ensaio / Amostra de água c/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
Bactérias coliformes	0	Número / 100 ml	0

## 5.5. Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes Fecais (*Escherichia coli*) - SM 9222 D

Para a preparação da amostra foram seguidas as instruções da norma SM 9222 D. Após filtração de 100 ml de cada amostra, transferiu-se a membrana filtrante para o meio de cultura m-FC Agar (membrane Faecal Coliform Agar) (Merck®, ref<sup>a</sup> 1.11278). No fim das 24 horas após incubação da placa de Petri com a respetiva membrana em estufa de incubação à temperatura de  $44,5 \pm 0,2$  °C, procedeu-se às observações das respetivas placas de Petri. Durante este processo não se verificou o desenvolvimento de colónias típicas (colónias que apresentem cor azul escura), nem o desenvolvimento de colónias atípicas no meio de cultura. A Tabela 21 apresenta o resultado da pesquisa das bactérias coliformes nas duas amostras de água.

**Tabela 21** - Resultados obtidos na pesquisa e quantificação de Bactérias coliformes fecais (*E. coli*) na amostra de água sem tratamento e com tratamento.

Ensaio / Amostra de água s/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
<i>Escherichia coli</i>	0	Número / 100 ml	0

Ensaio / Amostra de água c/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
<i>Escherichia coli</i>	0	Número / 100 ml	0

## 5.6. Método para contagem e isolamento de *Clostridium perfringens* - Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 para água de consumo humano pelo método de filtração de membrana

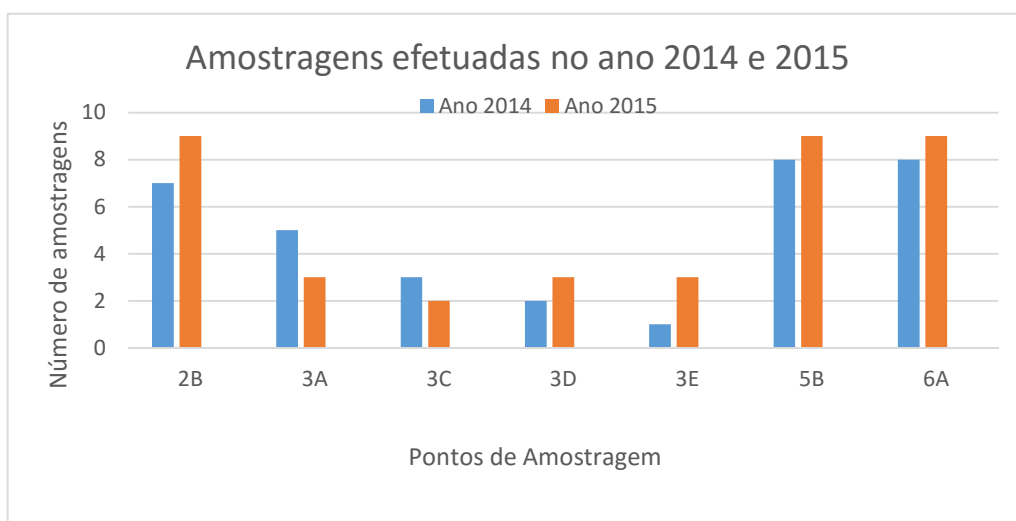
A contagem e isolamento de *Clostridium perfringens* foi baseada no Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto. Após a filtração de 100 ml de cada amostra, a membrana vai ser colocada com a quadrícula voltada para cima no meio de cultura diferencial m-CP Agar (membrane *Clostridium perfringens*) e incuba-se em anaerobiose durante  $21 \pm 3$  h à temperatura de  $44 \pm 0,5$  °C. Esta incubação é feita numa caixa de anaerobiose (GENbox Jarra 2,5l/bioMérieux®) onde se junta um gerador de anaerobiose (Genbox anaer/bioMérieux®) e um indicador deste ambiente (Anaer indicator/bioMérieux®). Após incubação, verificou-se que não houve desenvolvimento de colónias típicas, nem desenvolvimento de colónias atípicas para as duas amostras de água em questão.

**Tabela 22** - Resultados obtidos na pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens* na amostra de água sem tratamento e com tratamento.

Ensaio / Amostra de água s/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
<i>Clostridium perfringens</i>	0	Número / 100 ml	0
Ensaio / Amostra de água c/ tratamento	Resultado	Unidade	Valor paramétrico
<i>Clostridium perfringens</i>	0	Número / 100 ml	0

De acordo com os resultados obtidos neste caso prático, estes estão em perfeita concordância com os valores obtidos no período de referência deste trabalho, entre os anos de 2014 e 2015 como se demonstra no **Anexo C**, onde se encontram compilados todos os resultados microbiológicos obtidos neste estudo referentes aos vários pontos de amostragem.

Na **Figura 34** destacam-se as amostragens efetuadas para os sete pontos referenciados entre os anos de 2014 e 2015.



**Figura 34** - Número de amostragens efetuadas para cada ponto entre os anos de 2014 e 2015



## 6. Conclusões e perspectivas futuras

No desenvolvimento do presente trabalho, foi possível efetuar uma análise do percurso académico e profissional do candidato, começando na obtenção do grau de bacharelato, passando até à licenciatura em Engenharia Alimentar e evoluindo ao longo da sua atividade profissional.

Cada atividade exercida apresentou as suas especificidades, sendo que o conjunto de todas elas, contribuíram, em articulação com as formações adquiridas, para a aquisição e melhoria contínua de competências do candidato que lhe permitem exercer as funções atuais.

O caso prático apresentado permitiu caracterizar bacteriologicamente duas amostras de água para consumo humano, uma das amostras não possuía tratamento enquanto que a segunda amostra possuía tratamento por hipoclorito de sódio.

A nível laboratorial foi possível concluir que ambas as amostras de água encontravam-se de acordo com os requisitos microbiológicos definidos pelo Decreto-Lei N.º 306/2007, de 27 de agosto.

No que diz respeito ao parâmetro dos microrganismos a 22 °C e a 36 °C, concluiu-se que na amostra sem tratamento, o número de colónias superava as 300. Este resultado poderá ser devido a vários fatores e que não foram quantificados, nomeadamente o teor de cloro residual disponível na altura da amostragem.

Em termos gerais e durante o período considerado, os resultados obtidos para os vários parâmetros microbiológicos (Coliformes totais, Coliformes fecais (*Escherichia coli*), Enterococos, *Clostridium perfringens* e número de colónias a 22 °C e 36 °C), enquadraram-se dentro dos valores paramétricos exigidos pelo Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto. De referir e salientar que na colheita efetuada no dia 14 de outubro de 2014, nos pontos de amostragem 5B, 3A, e 3D, os valores relativamente ao número de colónias tanto a 22 °C como a 36 °C superaram as 300 colónias/ml.

Comprovou-se que a contagem total de microrganismos heterotróficos é um dos indicadores mais fiáveis e sensíveis do tratamento ou do fracasso do processo de desinfecção, da limpeza e integridade do sistema de distribuição (Pullés, M.R., 2014).

Considero que o trabalho desenvolvido e apresentado numa forma genérica como “caso prático”, foi útil e necessário atendendo à população servida. Contudo este trabalho é um trabalho incompleto, sugerindo o candidato a implementação de um plano mais geral e

profundo que envolva outros serviços desta Universidade. Sugiro a implementação de um Plano de Segurança da Água (PSA) para o sistema de captação, tratamento e distribuição da água, seguindo as recomendações da OMS e da Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos (ERSAR).

# Referências Bibliográficas

- Abelho, M. (2012). *Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental* - Curso de Especialização Tecnológica em Qualidade Ambiental. Escola Superior Agrária de Coimbra.
- Administração Regional de Saúde do Norte, I.P. (ARS Norte), Departamento de Saúde Pública (2013). *Orientações para a Execução do Programa de Vigilância Sanitária de Águas para Consumo Humano - 2014*.  
Portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Conteúdos/Saúde Pública Conteúdos/Agua\_Consumo\_Programa2014\_PVSACH.pdf. Cited 2015.
- Antunes da Silva, M. (2012). *Monitorização, Hidrodinâmica, Microbiologia e Físico-Química do Recurso de uma Captação*. APIAM - Associação Portuguesa dos Industriais de Águas Minerais Naturais e de Nascente. Caderno Técnico n.º 4.  
extranet.apiam.pt/upload/documentos/4665\_CADERNO%204.pdf. Cited 2015.
- Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas (APDA). *Fichas Técnicas de parâmetros microbiológicos* (2012).  
<http://www.apda.pt/site/upload/FT-MB-01> - Número de colónias a 22 °C e 36 °C.pdf. Cited 2015.  
<http://www.apda.pt/site/upload/FT-MB-02> - Bactérias coliformes.pdf. Cited 2015.  
<http://www.apda.pt/site/upload/FT-MB-03> - Escherichia coli.pdf. Cited 2015.  
<http://www.apda.pt/site/upload/FT-MB-04> - Enterococos intestinais.pdf. Cited 2015  
<http://www.apda.pt/site/upload/FT-MB-05> - Clostridium perfringens.pdf. Cited 2015.
- Ashbolt, N.J. (2015). *Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems*. Curr Envir Health Rpt, Volume 2, pp 95-106.
- Barros de Macêdo, J.A.; Barra, M.M. (2003) *Processos de desinfecção com derivados clorados orgânicos em água para abastecimento público*. 3º Encontro Mineiro de Ensino de Química. UFV-Viçosa-MG, Brasil.
- Barros de Macêdo, J.A.; Oliveira, F. S. (2010). *Desinfecção secundária. O estado de arte do processo desinfecção em ETA's, com redução de custos operacionais e garantia de qualidade*. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, vol.3, nº2, mar/jun, São Paulo, Brasil.

- Beleza, J.M.B.B. (2005). *Simulação das concentrações de cloro residual e tri-halometanos em redes de distribuição de água para consumo humano*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente (Ramo de Gestão e Tratamento de Resíduos Industriais). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal.
  
- Conte, V.D.; Colombo, M.; Zanrosso, A.V.; Salvador, M. (2004). *Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas na região nordeste do Rio Grande do Sul*. Infarma, v.16, n.º 11-12, Brasil.
  
- Council of the European Union. (1998). Council Directive 98/83/CE of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Off. J. Eur. Commun., Brussels. L330:32-54.
  
- Doelle, H.W. (1975). *Bacterial metabolism*. 2.<sup>ed.</sup>, Academic Press, New York, USA, 751p.
  
- Dutra da Silva, L.S.P. (2010). *Controlo da qualidade da água de consumo humano no concelho da Povoação (São Miguel): diagnóstico e implicações para a saúde pública*. Universidade dos Açores, Ponta Delgada, Portugal. Dissertação de mestrado.
  
- Engelkirk, P.G.; Duben-Engelkirk, J. (2012). *Burton Microbiologia para as ciências da Saúde*. 9.<sup>ed.</sup>, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 452p.
  
- Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR). Recomendações de 2005 a 2007: Recomendação IRAR n.º05/2007 - *Desinfecção da água destinada ao consumo humano*. Instituto Regulador de Águas e Resíduos.  
<http://www.ersar.pt/website/ViewContend.aspx?SubFolderPath=%5cContents%5cSítio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao%5cPublicacoesIRAR&Section=MenuPr>. Cited 2015.
  
- Ferreira, J.P.L.; Leitão, T.E.; Oliveira, M.M.; Rocha, J.S.; Barbosa, A.E. (2009). *Protecção das Origens Superficiais e Subterrâneas nos Sistemas de Abastecimento de Água*. Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR); Laboratório Nacional de Engenharia Civil. Série Guias Técnicos, n.º 11.
  
- Ferreira, W.F.C.; Sousa, J.C.F.S. (1998). *Microbiologia*. Vol. I, Lidel, Lisboa, Portugal, 342p.
  
- Forsythe, S.J. (2002). *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, 424p.
  
- Gava, A.J.; Bento da Silva, C.A.; Frias, J.R.G. (2008) *Tecnologia de Alimentos-Princípios e Aplicações*. Nobel, São Paulo, Brasil, 512p.

- Gerhard, P.R.; Murray, G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 791p.
- Gruber, J.S.; Ercumen, A.; Colford, J.R.Jr. (2014). *Coliform Bacteria as Indicators of Diarrheal Risk in Household Drinking Water: Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS ONE 9(9): e107429. doi:10.1371/journal.pone.0107429.
- Hoffmann, F.L. (2001). *Higiene-Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos*. Brasil Alimentos, n.º 9, Julho/Agosto, pp.23-30.
- ISO 6222:1999, Water Quality - *Enumeration of Culturable Micro-organisms - Colony Count by inoculation in a nutrient agar culture medium*.
- ISO 7899-2:2000, Water Quality - *Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci. Part 2: Membrane filtration method*.
- Iversen, C.; Lehner, A.; Mullane, N.; Bidlas, E.; Cleenwerch, I.; Marugg, J.; Fanning, S.; Stephan, R.; Joosten, H. (2007). *The taxonomy of Enterobacter sakazakii: proposal of a new genus Cronobacter gen. nov. and descriptions of Cronobacter sakazakii comb. nov. Cronobacter sakazakii subsp. Sakazakii, comb. nov., Cronobacter sakazakii subsp. Malonaticus subsp. nov., Cronobacter turicensis sp. nov., Cronobacter muytjensii sp. nov., Cronobacter dublinensis sp. nov. and Cronobacter genomospecies 1*. BMC Evol; 7:64.
- Jay, J.M. (1992). *Microbiologia moderna de los alimentos*. 5.<sup>ed.</sup>. Acribia, Zaragoza, España, 804p.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2004). *Brock Biología de los Microorganismos*. 10.<sup>ed.</sup>. Editorial Pearson/Prentice Hall, Madrid, España, 1096p.
- Marquezi, M.C. (2010). *Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água*. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil, Dissertação de mestrado.
- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 3 ed. Editorial Médica Panamericana, SA, Madrid, España, 850p.
- *Merck Microbiology Manual*. (2000). 12.<sup>ed.</sup>, 688p. <https://Microbiology.book>. Cited 2015.

- Meyer, S.T. (1994). *O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública*. Cad. Saúde Públ., Rio de Janeiro, 10(1):99-110, jan/mar. Brasil.
  
- Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Decreto-lei n.º 306/2007, de 27 de agosto de 2007, Diário da República - I Série - N.º 164. Lisboa. pp.5747-5765.
  
- Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Pfaller, M.A. (2014). *Microbiologia Médica*. 7.<sup>ed.</sup> Elsevier Editora, Rio de Janeiro, Brasil, 888p.
  
- Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (2008). *Microbiology*. 7.<sup>ed.</sup>, McGraw-Hill Companies Inc., New York, USA., 1088p.
  
- Public Health England. (2015). *Staining Procedures*. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 39 Issue 2.1. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Cited 2016.
  
- Public Health England. (2014). *Indole Test*. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 19 Issue 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Cited 2016.
  
- Pullés, M.R. (2014). Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol.45, No 1, pp, 25-36. Centro Nacional de Investigaciones Científica. Ciudad de La Habana, Cuba.
  
- Relatório Anual dos Serviços de Águas e Resíduos em Portugal (RASARP). (2015). Volume 2 - *Controlo da qualidade da água para consumo humano*. <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?SubFolderPath=%5cRoot%5cContents%5cSitio%5cMenuPrincipal%5cDocumentacao%5cPublicacoesIRAR&BookCategoryID>: Cited 2015.
  
- Rosa, D.D. (2008). *Método rápido de extração de DNA das bactérias*. Summa phytopathol. Vol.34 n.3. Botucatu, Brasil.
  
- Samaranayake, L. (2013). *Fundamentos de Microbiologia e Imunologia na Odontologia*. 4.<sup>ed.</sup> Elsevier Ed., Rio de Janeiro, Brasil, 360p.
  
- Sartorius (2014). *Ensaio Microbiológico de Alimentos, Bebidas, Água Potável e Produtos Farmacêuticos*. Publication No.: SM-4017ac140604 ver.06/2014. [https://Broch\\_Microbiological\\_Testing\\_SM-4017ac.pdf](https://Broch_Microbiological_Testing_SM-4017ac.pdf). Cited 2015.

- Scapin, D.; Rossi, E.M.; Oro, D. (2012). *Qualidade microbiológica da água utilizada para consumo humano na região do extremo oeste de Santa Catarina*. Rev. Inst. Adolfo Lutz. São Paulo, 71(3):593-6, Brasil.
  
- Schlegel, H.G. (1996). *Microbiologia general*. Ediciones Omega SA, 4.<sup>ed.</sup>, Barcelona, España, 672p.
  
- Sousa, A.; Taveira, M.; Silva, L. (2015). *Groundwater from Private Drinking Water Wells: Imminent Public Health Issue*. Water Resources, 42, (4):517-524. Pleiades Publishing, Ltd.
  
- SM 9222B: Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure, 2009.
  
- SM 9222 D: Fecal Coliform Membrane Filter Procedure, 2009.
  
- *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (2012). 22.<sup>ed.</sup>, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
  
- Teixeira de Carvalho, I. (2010). *Microbiologia Básica*. EDUFRPE, Recife, Brasil.
  
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2012) *Microbiologia*. 10.<sup>ed.</sup>. Artmed Ed. SA, Porto Alegre, Brasil, 964p.
  
- Vieira, J.M.P. and Morais, C. (2005). *Planos de segurança em sistemas públicos de abastecimento de água para consumo humano*. Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), Universidade do Minho, Braga, Portugal.
  
- Zimbro, M.J.; Power, D.A.; Miller, S.M.; Wilson, G.E.; Johnson, J.A. (2009). Difco™ and BBL™ Manual: *Manual of Microbiological Culture Media*. 2.<sup>ed.</sup>, Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA, 679p. [https://difcobblmanual\\_2nded\\_lowres.pdf](https://difcobblmanual_2nded_lowres.pdf). Cited 2015.
  
- World Health Organization (WHO). *Water and Sanitation*. World Health Organization Regional Office for Europe, 2013. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/environment-and-health/water-and-sanitation/data-and-statistics>. Cited 2015.



# Anexo A



## ANEXO A1 - Certificados de Habilitações



Instituto Politécnico de Castelo Branco  
Escola Superior Agrária

### CERTIDÃO DE CONCLUSÃO DE CURSO

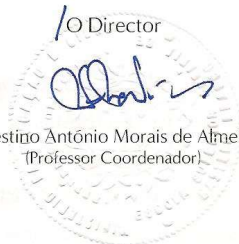
*Celestino António Morais de Almeida*, Director da *Escola Superior Agrária de Castelo Branco* do Instituto Politécnico de Castelo Branco certifica, em face dos registos existentes nesta Escola, que **JOÃO JOSÉ POPO LOBO ANTUNES PEREIRA**, nascido(a) a *02 de Outubro de 1964*, portador(a) do documento de identificação n.º *6582048*, concluiu em *05 de Dezembro de 2008*, o **2º Ciclo do Curso de Biotécnico de Licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar**, sendo-lhe atribuído o grau de *Licenciado*, com classificação final de *12 (doze)* valores, tendo obtido aprovação nas seguintes disciplinas:

Disciplinas	Data de Aprovação	Classificação	Classificação (por extenso)
Enologia	15-02-2007	14	Catorze Valores
Tecnologia do Azeite	19-01-2007	13	Treze Valores
Tratamento de Águas de Abastecimento e Residuais	02-07-2008	11	Onze Valores
Tecnologia do Pescado	19-02-2008	10	Dez Valores
Tecnologia do Frio Industrial	25-06-2007	13	Treze Valores
Toxicologia	21-06-2007	10	Dez Valores
Instrumentação e Controlo	31-07-2007	16	Dezasseis Valores
Tecnologia dos Produtos Lácteos	06-07-2007	10	Dez Valores
Instalações e Equipamentos Agro-Industriais	19-01-2007	13	Treze Valores
Embalagem e Armazenamento	12-02-2007	14	Catorze Valores
Mercados, Comercialização e Marketing	18-01-2007	12	Doze Valores
Tecnologia dos Produtos Cárneos	10-07-2007	12	Doze Valores
Tratamento e Valorização de Resíduos Sólidos	16-10-2008	11	Onze Valores
Projectos de Investimento e Modernização	22-02-2008	14	Catorze Valores
Bioética	15-01-2008	14	Catorze Valores
Análise de Risco	18-01-2008	11	Onze Valores
Gestão da Qualidade	16-01-2008	10	Dez Valores
Culturas Celulares	30-01-2008	10	Dez Valores
Estágio e Trabalho de Licenciatura	05-12-2008	16	Dezasseis Valores

A presente certidão vai firmada com o selo branco em uso nesta Escola.

Escola Superior Agrária de Castelo Branco, em 12 de Janeiro de 2011

/O Director



Celestino António Morais de Almeida  
(Professor Coordenador)

Emolumentos: €50,00

Registo n.º 12

Emitida por: *Rosa*

Conferida por: *Luís*



## CERTIDÃO

---- **Maria da Piedade Antunes Pedro**, Chefe de Secção da Área Administrativa, da ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE COIMBRA: -----

---- Certifica, em face dos registos existentes nesta Escola, que **JOÃO JOSÉ POPO LOBO ANTUNES PEREIRA**, natural da Freguesia de Guarda (S. Vicente), do Concelho de Guarda, do Distrito de Guarda, nascido(a) a 02 de Outubro de 1964, filho(a) de José Antunes Pereira e de Maria do Carmo Lopes Popo Lobo Pereira, concluiu nesta Escola o Curso de Licenciatura em Engenharia Alimentar, no dia 15 de Julho de 2008, tendo obtido a classificação final de Suficiente com 11 (Onze) valores. ---

---- Foi-lhe conferido o grau de Licenciado(a) nos termos do Cap. II, do Decreto-Lei nº 74/2006 de 24 de Março.-----

---- O(a) interessado(a) já requereu o diploma de Curso e depositou a importância correspondente a todas as despesas. -----

---- O presente certificado vai autenticado com o selo branco em uso nesta Escola.-----

**Escola Superior Agrária de Coimbra**, em 16 de Julho de 2008

Emol. : 15,00 €

Conf. por :

A Chefe da Secção





CERTIDÃO

*FRANCISCO MIGUÊNS AFONSO, Licenciado em Direito pela Faculdade de Direito da Universidade de Coimbra, servindo de Secretário da Escola Superior Agrária de Coimbra.*

*Certifica, em face dos respectivos documentos, que **JOÃO JOSÉ POPO LOBO ANTUNES PEREIRA**, filho de José Antunes Pereira e de Maria do Carmo Lopes Popo Lobo Pereira, natural da Guarda (Sé), concelho da Guarda, distrito da Guarda, nascido em dois de Outubro de mil novecentos e sessenta e quatro, concluiu no dia dezanove de Dezembro de mil novecentos e noventa e seis, o Bacharelato em Tecnologia das Indústrias Agro-Alimentares, tendo-lhe sido atribuída a classificação final de Suficiente, com 11(ONZE)valores.*

*-----Pela Portaria nº 290/96, de 24 de Julho, o Curso de Bacharelato em Tecnologia das Indústrias Agro-Alimentares passou a designar-se Engenharia das Indústrias Agro-Alimentares.*

*-----O interessado já requereu o diploma de Curso e depositou a importância correspondente a todas as despesas.*

*-----Secretaria da Escola Superior Agrária de Coimbra, em quinze de Janeiro de mil novecentos e noventa e sete.*

Emol. 1 500\$00

Pel' O SECRETÁRIO,

## ANEXO A2 - Certificados de Trabalho



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
NCP/VAT PT 502 083 514

### CERTIDÃO

Alda Emilia Bebiano de Castro Martins Oliveira Ribeiro, Licenciada em Direito pela Universidade de Coimbra e Chefe de Divisão de Expediente e Pessoal da Universidade da Beira Interior, certifica para os devidos efeitos, que **JOÃO JOSÉ POPO LOBO ANTUNES PEREIRA**, exerce funções de Técnico de 2ª classe, com contrato de trabalho a termo resolutivo certo, no Departamento de Química desta Universidade, desde 6 de Maio de 2002 até à presente data.

Por ser verdade e me ter sido pedida, mandei passar a presente certidão que vai por mim assinada e autenticada com o selo branco em uso neste Estabelecimento de Ensino Superior.

Covilhã e UBI em 14 de Dezembro de 2007.

A Chefe de Divisão

*Alda Bebiano Ribeiro*

Confere: <i>na Luces</i>
Data <i>14.12.07</i>
Emolumentos <i>16,00.€</i>
Recibo nº <i>1846</i>

*JA*

## DECLARAÇÃO

José Manuel Soares R Oliveira, gerente da firma, **TECNILAC – TÉCNICAS AGRO INDUSTRIAIS, LDA**, com sede na Zona Industrial de Mundão - Viseu, declara para os devidos efeitos que o senhor **JOÃO JOSÉ POPO LOBO A PEREIRA**, portador do BI 6582048, emitido em 12/12/1995, pelo A I. de Castelo Branco, exerceu funções de Técnico Comercial nesta empresa, no período que decorreu de Novembro de 2000 a Março de 2001.

Por ser verdade e nos ter sido pedido emite-se a presente declaração que vai ser assinada.

Viseu, 21 de Dezembro de 2007

  
**TECNILAC**  
TÉC. AGRO-IND., LDA.  
A GERÊNCIA

## ANEXO A3 - Comprovativos da atividade como Formador



Mod.AFTEBI.A-026.rev02

### DECLARAÇÃO COMPROVATIVA DA EXPERIÊNCIA FORMATIVA

Declara-se que **João José Popo Lobo Antunes Pereira**, portador do Documento de Identificação **Cartão de Cidadão** n.º **06582048 7ZZ4**, válido até 23/08/2016 exerceu funções como formador na AFTEBI – Associação para a Formação Tecnológica e Profissional da Beira Interior – Pólo da Covilhã, com sede na Quinta da Corredoura, Apartado 517 – 6201-907 Covilhã, representada por Cristina Maria dos Reis Alves Menaia, portadora do documento de identificação Cartão do Cidadão n.º 09118016, válido até 09/09/2019, de acordo com o que a seguir se descreve:

Ano Escolar (01/09 a 31/08)	Data de Início (Dia/Mês)	Data de Conclusão (Dia/Mês)	Componente de Formação	Domínio/Unidade de Formação	Nível	Duração (Horas)
2009/2010	26-05-2010	21-10-2010	Tecnológica	Microbiologia Ambiental	V	25
2010/2011	28-10-2010	14-02-2011	Tecnológica	Microbiologia Ambiental	V	25

\* O Nível V corresponde a Cursos de Especialização Tecnológica, conforme Portaria N.º 782/2009 de 23 de Julho.

Covilhã, 30 de setembro de 2015

A Directora Executiva da AFTEBI

(Cristina Reis)



Pág. 1 de 1

### DECLARAÇÃO COMPROVATIVA DA EXPERIÊNCIA FORMATIVA

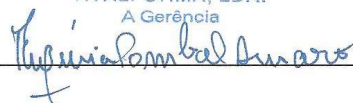
Declara-se para os devidos efeitos que, **João José Popo Lobo Antunes Pereira**, portador/a do Cartão de Cidadão, com Identificação Civil Nº. 06582048, emitido pela República Portuguesa, com validade até 23-08-2016, exerceu funções como Formador/a, na AVALFORMA – Formação e Consultoria, Lda., com sede na Rua Álvaro Benamor, Loja 1 A, 1600-894 Lisboa, representada por Maria Eugénia Gomes Pombal Amaro, portadora do Cartão de Cidadão, com Identificação Civil Nº. 06261973, emitido pela República Portuguesa, de acordo com o que a seguir se descreve:

Unidade de Formação/ Curso	Período de Realização	Nº. Horas
Técnicas de Boas Práticas	10-10-2006 a 14-11-2006	30 Horas
Segurança Alimentar (HACCP)	06-10-2006 a 02-12-2006	24 Horas

Lisboa, 3 de Setembro de 2015

A Gestora da Formação

AVALFORMA, LDA.  
A Gerência





MINISTÉRIO DO TRABALHO E DA SOLIDARIEDADE SOCIAL



INSTITUTO DO EMPREGO E FORMAÇÃO PROFISSIONAL

**SNOP**

SISTEMA NACIONAL DE CERTIFICAÇÃO PROFISSIONAL

## CERTIFICADO DE APTIDÃO PROFISSIONAL

[Decreto-Lei n.º 95/92, de 23 de Maio e Decreto-Regulamentar n.º 68/94, de 26 de Novembro]

Certifica-se que **JOÃO JOSÉ POPO LOBO ANTUNES PEREIRA** nascido em 1964.10.02, natural de Guarda, portador de Bilhete de Identidade n.º 6582048 emitido pelo Arquivo de Identificação de Castelo branco, em 2002.10.07, possui, desde 2006.08.09, competências pedagógicas para exercer a profissão de **FORMADOR (M/F)**, conforme as que são definidas no respectivo perfil profissional.



Instituto do Emprego e Formação Profissional, entidade certificadora competente ao abrigo Decretos Regulamentares 66/94, de 18 de Novembro e 26/97 de 18 de Junho.

Coimbra, 09 de Agosto de 2006

O Subdelegado Regional

*João Cravino*  
(João Cravino)

Certificado n.º EDF 413248/2006 DC

Válido até 2011.08.09



## ANEXO A4 - Certificados de Formação

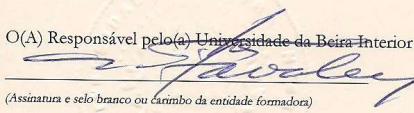
### Certificado de Formação Profissional

Certifica-se que João José Popo Lobo Antunes Pereira natural de Guarda nascido em 02/10/1964, com o N.º de Cartão de Cidadão 06582048 7ZZ4 válido até 23/08/2016, concluiu com aproveitamento o curso de Formação Profissional de Access, em 31/05/2013, com a duração de 25 horas.

Unidades de Formação/Módulos/Outras Designações	Horas	Classificação ..
Introdução	1	-
Principais novidades do Microsoft Access 2010	2	-
A interface do Microsoft Access 2010	3	-
Noções básicas de bases de dados	2	-
Criação de uma base de dados	2	-
Construção de tabelas eficientes	3	-
Manipulação de dados com consultas	2	-
Construir uma interface com formulários	2	-
Impressão de relatórios	2	-
Gestão da base de dados	2	-
Projeto	4	-

Covilhã, 10 de Julho de 2013

O(A) Responsável pelo(a) Universidade da Beira Interior

  
(Assinatura e selo branco ou carimbo da entidade formadora)

Certificado n.º 105/2013 de acordo com o modelo publicado na Portaria n.º 474/2010

## Certificado de Formação Profissional

Certifica-se que João José Popo Lobo Antunes Pereira natural de Guarda nascido em 02/10/1964, com o N.º de Identificação Civil 6582048 válido até 07/11/2012, concluiu com aproveitamento o curso de Formação Profissional de Gestão da Qualidade, em 22/09/2011, com a duração de 25 horas.

Unidades de Formação/Módulos/Outras Designações	Horas	Classificação 0..20
Conceitos e Princípios de Gestão e sua Evolução Histórica	1	-
Filosofia da ISO 9001:2000 e das ISO 14001 e OSHAS18000	2	-
A norma ISO 9001	5	-
Comunicação na Empresa	3	-
Gestão por processos	3	-
Indicadores da Qualidade	5	-
Melhoria Contínua	3	-
Balanced Scorecard	3	-
<b>Nota Final</b>		<b>19</b>

Covilhã, 10 de Janeiro de 2012

O(A) Responsável pelo(a) Universidade da Beira Interior

  
(Assinatura e selo branco ou carimbo da entidade formadora)

Certificado n.º 272/2011 de acordo com o modelo publicado na Portaria n.º 474/2010

## Certificado de Formação Profissional

Certifica-se que João José Popo Lobo Antunes Pereira natural de Guarda nascido em 02/10/1964, com o N.º de Identificação Civil 6582048 válido até 07/11/2012, concluiu com aproveitamento o curso de Formação Profissional de Gestão e Aprovisionamento de Compras Públicas, em 12/12/2011, com a duração de 25 horas.

Unidades de Formação/Módulos/Outras Designações	Horas	Classificação 0..20
Negociação Electrónica	2	-
Fases principais dos processos de compra	7	-
Novo Código dos Contratos Públicos	3	-
Processos de Compra e Plataformas Electrónicas de Contratação Pública	8	-
Processos de preparação das peças de procedimentos	5	-
Nota Final		16

Covilhã, 10 de Janeiro de 2012

O(A) Responsável pelo(a) Universidade da Beira Interior

(Assinatura e selo branco ou carimbo da entidade formadora)

Certificado n.º 249/2011 de acordo com o modelo publicado na Portaria n.º 474/2010



## CERTIFICADO

**VWR International certifica que os colaboradores da UBI constantes no verso, participaram na acção de formação: “GHS Nova simbologia de perigos químicos”, realizada na Universidade da Beira Interior.**

### **GHS - Nova simbologia de perigos químicos**

Conteúdo programático:

- Objectivo do GHS, situação actual futura
- Comparação entre simbologia existente e nova
- Comparação entre frases R e S e frases HP
- Novos pictogramas – explicação das mudanças

Duração total: 1 hora

Data: 17.02.2011

Formador: Eng<sup>o</sup> Lurdes Teixeira ( VWR International)



**Isabel Silva**  
Marketing Communication Manager      Fevereiro de 2011



**Assistentes**

Ana Maria da Costa Brás

Ana Sofia dos Santos Duarte

António José G. Mendonça

Carlos Manuel dos Santos Anjo

Isabel Correia Lopes Aibéo

João José P.L. Antunes Pereira

João Pedro Marques Barata Matos

Luís António Ferreira Matias

Luís Miguel Silva João Couto Gonçalves

Margarida Maria Brito Carrilho

Maria Dulce Fonseca Anastácio

Maria Emília Amaral

Maria José Santos Pinto

**Isabel Silva**  
**Marketing Communication Manager**    **Fevereiro de 2011**



UBI  
Covilhã  
Portugal



Certificado N.º  
018/2011

# Certificado

Certifica-se que **João José P. L. Antunes Pereira**, natural de **Guarda**, nascido(a) a **02-10-1964**, titular do N.º de Identificação **6582048**, válido até **07-11-2012**, concluiu com aproveitamento, o curso de formação profissional de

## HIGIENE E SEGURANÇA NO TRABALHO

em **27/01/2011**, com a duração de **25 horas**, que decorreu na Covilhã, de **10/01/2011** a **27/01/2011**, tendo obtido a classificação final de **Muito Bom**, numa escala qualitativa de quatro níveis (*Insuficiente; Suficiente; Bom e Muito Bom*).

Covilhã, 08 de Fevereiro de 2011

O Vice-Reitor

Victor Manuel Pissarra Cavaleiro

# HIGIENE E SEGURANÇA NO TRABALHO



**UBI**  
Covilhã  
Portugal



Certificado N.º  
018/2011

**Modalidade de Formação:** Formação Contínua

**Área de Formação:** Segurança e Higiene no Trabalho

**Competências Adquiridas:** Dotação de conhecimentos sobre o quadro jurídico acerca da Segurança, Higiene e Saúde no Trabalho, aplicável aos respectivos sectores de actividade; Capacidade para promover a melhoria das condições de Higiene e Segurança nos locais de trabalho; Reconhecer a importância, objectivos e fundamentos da Segurança e Higiene no Trabalho.

Módulos	Duração
1.º Módulo - Conceitos básicos de Higiene e Segurança no Trabalho	4
2.º Módulo - Avaliação e controlo de riscos	5
3.º Módulo - Enquadramento legal da Higiene e Segurança do Trabalho	4
4.º Módulo - Regras legais sobre sinalização dos locais de trabalho	4
5.º Módulo - Normas relativas aos equipamentos de protecção individual	4
6.º Módulo - Ambiente e organização do trabalho	4
<b>Duração Total</b>	<b>25 horas</b>

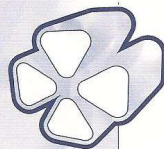
Covilhã, 08 de Fevereiro de 2011

O Vice-Reitor

Victor Manuel Pissarra Cavaleiro

Entidade Formadora Acreditada pela DGERT - Direcção Geral do Emprego e das Relações de Trabalho, nos termos da Portaria n.º 782/97, de 29 de Agosto - Proc. N.º 1637.  
Certificado de Formação Profissional, emitido conforme o exigido pelo Sistema Nacional de Certificação Profissional, nos termos do Decreto Regulamentar n.º 35/2002, de 23 de Abril, do Decreto-Lei n.º 95/92, de 23 de Maio e do Decreto Regulamentar n.º 68/94, de 26 de Novembro.

Convento de Santo António, 6201-001 Covilhã, PORTUGAL | Telef.: +351 275 319 700 | Fax: +351 275 319 057  
E-mail: [gera@ubi.pt](mailto:gera@ubi.pt) | [www.ubi.pt](http://www.ubi.pt)



formação



citeve

Centro Tecnológico  
das Indústrias Têxtil  
e do Vestuário  
de Portugal

# CERTIFICADO DE FREQUÊNCIA DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL

(Decreto Regulamentar n.º 35/2002, de 23 de Abril)

CITEVE - Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal, contribuinte n.º 502 201 886, com Residência na Quinta da Corredoura, 6201 - 907 Covilhã

Certifica-se que, **João José Popo Lobo Antunes Pereira**, natural da Guarda (Sé), nascido(a) a 02/10/1964, nacionalidade Portuguesa, sexo Masculino, portador(a) do documento de Identificação Bilhete de Identidade n.º 6582048, emitido por Castelo Branco em 07/10/2002, frequentou de 11/09/2006 a 20/11/2006, com a duração total de 30 horas, o Curso de Formação Profissional

## QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

Covilhã, 20 de Novembro de 2006

Certificado N.º 4008/2006



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Social Europeu



GOVERNO DA REPÚBLICA  
PORTUGUESA



PROGRAMA OPERACIONAL EMPREGO,  
FORMAÇÃO E DESARROLHO SOCIAL  
(POSDR)

O Responsável pela Entidade Formadora

(Augusto Lima)

**MODALIDADE DE FORMAÇÃO:** Formação de Actualização/Aperfeiçoamento

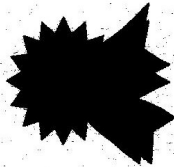
**ÁREA DE FORMAÇÃO:** 542 – Têxtil, vestuário, calçado e couro

**PLANO CURRICULAR:**

- 1. Aspectos gerais da Água: ..... **4 horas**
  - 1.1. *Origens de água;*
  - 1.2. *Poluição da água.*
- 2. Água destinada ao consumo humano - Enquadramento legislativo ..... **6 horas**
- 3. Parâmetros de Qualidade da Água: ..... **12 horas**
  - 3.1. *Considerações gerais;*
  - 3.2. *Parâmetros microbiológicos;*
  - 3.3. *Parâmetros físico - químicos;*
  - 3.4. *Parâmetros Orgânicos;*
  - 3.5. *Parâmetros radioactivos.*
- 4. Interpretação de Resultados ..... **4 horas**
- 5. Implementação de medidas correctivas ..... **4 horas**

**OBSERVAÇÕES:** O curso não prevê nenhum processo de avaliação

**Avalforma - Formação e Consultoria, Lda.**  
Av. do Uruguai, nº 18 - 1º Esq. - 1500-613 Lisboa  
NIPC 504016962  
Entidade Acreditada nº 1364



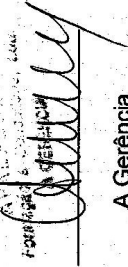
## CERTIFICADO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL

(Dec. Reg. nº 35/2002, de 23 de Abril)

Certifica-se que **JOÃO JOSÉ POPO LOBO ANTUNES PEREIRA**, natural da Guarda, nascido a 02-10-1964, nacionalidade Portuguesa, sexo masculino, portador do Bilhete de Identidade n.º 6582048, emitido em 07-10-2002, pelo Arquivo de Identificação de Castelo Branco, concluiu **COM APROVEITAMENTO**, o Curso de **FORMAÇÃO PEDAGÓGICA INICIAL DE FORMADORES**, certificado de Homologação n.º EDF/693/05/DL, que decorreu na Covilhã, no período de **20-03-2006 a 23-05-2006**, com a duração total de **100 Horas**, tendo obtido a classificação final de **17 (Dezassete) Valores**, numa escala de 0 a 20.

Lisboa, 30 de Maio de 2006

Certificado n.º 268 /06

  
A Gerência

**MODALIDADE DE FORMAÇÃO:** Formação Profissional Contínua

**ÁREA DE FORMAÇÃO:** Formação Profissional

**COMPETÊNCIAS ADQUIRIDAS:** Os Formandos estão aptos a Planificar e Ministrar Acções de Formação, aplicando as Metodologias e Técnicas Pedagógicas adequadas a um desempenho eficaz da função de formador.

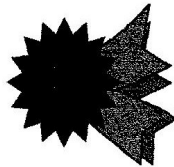
**PLANO CURRICULAR:**

<b>DESIGNAÇÃO DOS MÓDULOS</b>	<b>TOTAL</b>
O Formador face aos Sistemas e Contextos de Formação	4
Processos de Aprendizagem	8
Relação Pedagógica	8
Metodologia Pedagógica	8
Planificação da Formação	8
Objectivos Pedagógicos	8
Acompanhamento e Avaliação da Formação	8
Recursos Técnico-Pedagógicos na Formação	12
Simulação Pedagógica Inicial	8
Plano de Sessão	8
Avaliação da Aprendizagem	8
Proposta de Intervenção Pedagógica	4
Simulação Pedagógica Final	8
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>

**A**valforma - Formação e Consultoria, Lda.  
Av. do Uruguai, nº 18 - 1º Esq. - 1500-613 Lisboa  
NIPC 504016962  
Entidade Acreditada nº 1364



POEFDS



## CERTIFICADO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL

(Dec. Reg. nº 35/2002, de 23 de Abril)

Certifica-se que **JOÃO JOSÉ POPO LOBO ANTUNES PEREIRA**, natural da Guarda, nascido a 02-10-1964, nacionalidade Portuguesa, sexo masculino, portador do Bilhete de Identidade n.º 6582048, emitido em 07/10/2002 pelo Arquivo de Identificação de Castelo Branco, concluiu **COM APROVEITAMENTO**, o Curso de Formação Profissional **SEGURANÇA ALIMENTAR**, ao abrigo do **PROGRAMA OPERACIONAL EMPREGO, FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO SOCIAL - POEFDS**, que decorreu de 17-09-2003 a 22-11-2003, com a duração total de 100 Horas, tendo obtido a classificação final de BOM.

Lisboa, 28 de Novembro de 2003

Certificado n.º 547/03



Comunidade Europeia  
Fundo Social Europeu

**AVAFORMA**  
Formação e Consultoria, Lda.  
A GERÊNCIA

O Coordenador

A Gerência



Governo da República Portuguesa  
Ministério do Trabalho e da Solidariedade

**MODALIDADE DE FORMAÇÃO:** Formação Profissional Contínua

**ÁREA DE FORMAÇÃO:** Indústrias Alimentares

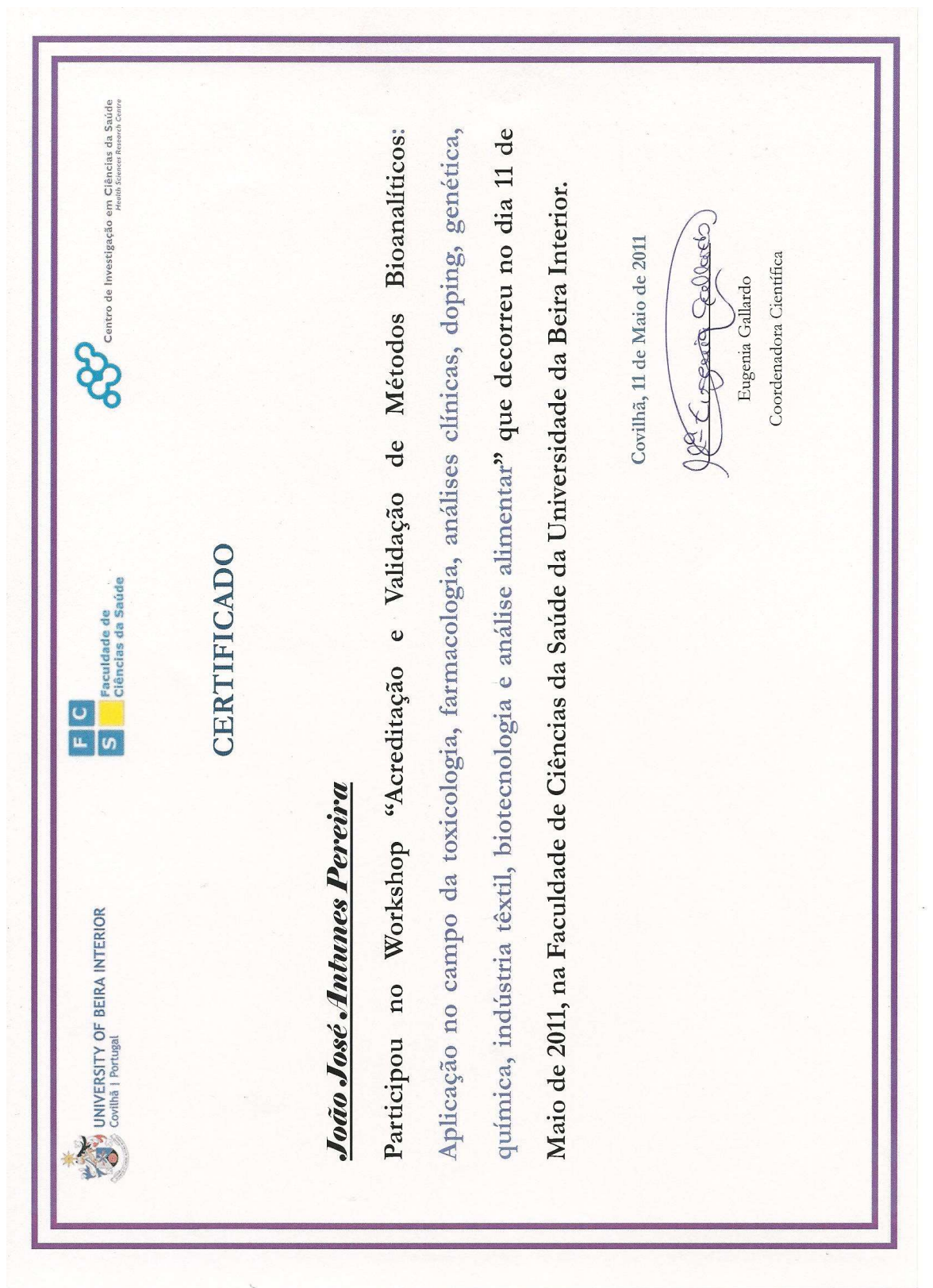
**COMPETÊNCIAS ADQUIRIDAS:** À saída da formação, os Formandos deverão ser capazes de elaborar e implementar um Sistema Preventivo de Segurança Alimentar, com base na análise de perigos e controlo de pontos críticos (HACCP).

**PLANO CURRICULAR:**

<b>DESIGNAÇÃO DOS MÓDULOS</b>	<b>SC</b>	<b>CT</b>	<b>PS</b>	<b>PCT</b>	<b>TOTAL</b>
Tecnologias de Informação e Comunicação	8				8
Sensibilização Ambiental	4				4
Igualdade de Oportunidades	4				4
Conceitos Básicos de Saúde, Biologia e Microbiologia		12			12
Higiene e Manipulação de Alimentos		6	2		8
Controlo dos Pontos Críticos na Cadeia Alimentar (HACCP)		12	20		32
Conservação dos Alimentos		6	2		8
Higiene e Sanificação		6	6		12
Legislação Alimentar		4	4		8
Auditorias HACCP		3	1		4
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>49</b>	<b>35</b>		<b>100</b>



## ANEXO A5 - Comprovativos de Participação em Seminários e Congressos





**30 de Março de 2012**  
**Escola Superior Agrária de Castelo Branco**

**Seminário (Entrada livre)**

**PCR em Tempo Real - Vantagens para a Indústria Alimentar e a Saúde Pública**  
**duma metodologia super rápida para detecção de microrganismos patogénicos**

**Programa (14H00, no A2)**

Método de referência (ISO) e técnicas alternativas validadas pelas AFNOR e AOAC (20 min)

Descrição teórica do PCR em tempo real (45 min)

**Parte prática: iQ-Check *Listeria mono* – extracção e amplificação de DNA de amostras alimentares (00 min)**

Intervalo

Benefícios da utilização do PCR para resultados super rápidos na detecção dos microrganismos patogénicos em alimentos (45 min)

Problemática da *Legionella*: risco sanitário, risco mediático, risco económico (30 min)

Aplicações e vantagens do PCR para monitorizar *Legionella* (45 min)

**Leitura dos resultados (20 min)**

Conclusão

**Orador: Jean-François JOCHIM**

**FSD Sales Manager Southern Europe / Food Science Division**

**Inscrições** até ao dia 27 de Março para o telefone 272339920 ou para o email [cpintado@ipcb.pt](mailto:cpintado@ipcb.pt)

A participação na parte prática, a decorrer no Laboratório de Microbiologia, está reservada a um número limitado de inscritos.

Seminário organizado no âmbito da unidade curricular de Microbiologia Avançada do Curso de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, com o apoio da Bio-Rad



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Covilhã | Portugal

# CERTIFICADO

Certifica-se para os devidos efeitos que José José Antunes Pereira  
participou no seminário **SEGURANÇA ALIMENTAR: LEGISLAÇÃO E CERTIFICAÇÃO** o qual  
decorreu na Covilhã no dia 26 de Novembro de 2010.



*[Handwritten signature]*

A Comissão Organizadora

# CERTIFICADO



## Simpósio

### “Inovação e Segurança Alimentar”

Certifica-se que **João Antunes Pereira** participou no **Simpósio “Inovação e Segurança Alimentar”** que decorreu nos dias 28 e 29 de Novembro de 2007, organizado pela Associação de Estudantes da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

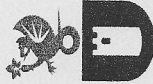
Castelo Branco, 29 de Novembro de 2007

O Director da ESACB

António Moitinho Rodrigues

O Presidente da AEESACB

Jorge Pereira



Instituto Politécnico de Castelo Branco  
Escola Superior Agrária

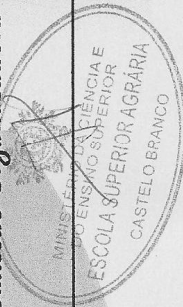
## Certificado

Certifica-se que JOÃO JOSÉ P. L. ANTUNES PEREIRA, participou nas  
Jornadas "Inovação na Indústria Alimentar, realizadas na Escola  
Superior Agrária de Castelo Branco no dia 9 de Maio de 2007.

A Comissão Organizadora



Castelo Branco, 9 de Maio de 2007



## Certificado de Presença

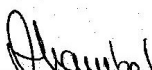
Para os devidos efeitos certifica-se que

***João José Antunes Pereira***

esteve presente no

***Seminário sobre Segurança Biológica***

que se realizou no dia 28 de Abril de 2006,  
na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,  
em Coimbra



**A. Chambel**  
FSG (Grupo Hucoa-Erlöss SA)



**J. Soler**  
Telstar Industrial, SL

## **Contéudo Programático**

Prevenção de risco biológico e a sua classificação

Protecção pessoal dos utilizadores

Nova norma Europeia EN 12469

Quadro legal Português

## **Horas Lectivas**

4 horas



# Jornadas da Alimentação 2004

Higiene, Segurança,  
Qualidade  
e Inovação

## Certificado

Certifica-se que **DOÃO JOSE P. L. ANTUNES PEREIRA** participou nas Jornadas "Jornadas da Alimentação 2004 - Higiene, Segurança, Qualidade e Inovação" organizadas pela FIPA, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e FIDES, no dia 1 de Junho de 2004, no Auditório Agostinho da Silva, da Universidade Lusófona, em Lisboa.

Comissão Organizadora

PATROCÍNIO:



SUPOIO:



ORGANIZAÇÃO:





4.ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente  
Lisboa • 6 a 8 de Abril • 1994


### Declaração

Para os devidos efeitos, declara-se que

**João José Popo Lobo Antunes Pereira**

participou na 4.ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente.

Monte da Caparica, 7 de Abril de 1994

  
O Presidente da Comissão Organizadora

Prof. Doutor Fernando Santana

Departamento de Ciências e Engenharia  
Quinta da Torre • 2825 MONTE  
do Ambiente • Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa  
A CAPARICA • Telef.: 295 44 64 • Telefax: 294 24 41 • Telex: 14 542 FCTULN.P



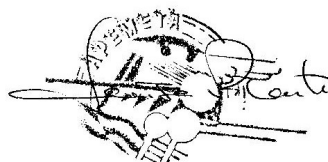
**APEMETA**

**TRATAMENTOS FÍSICOS E FÍSICO-QUÍMICOS  
EM ÁGUAS RESIDUAIS**

---

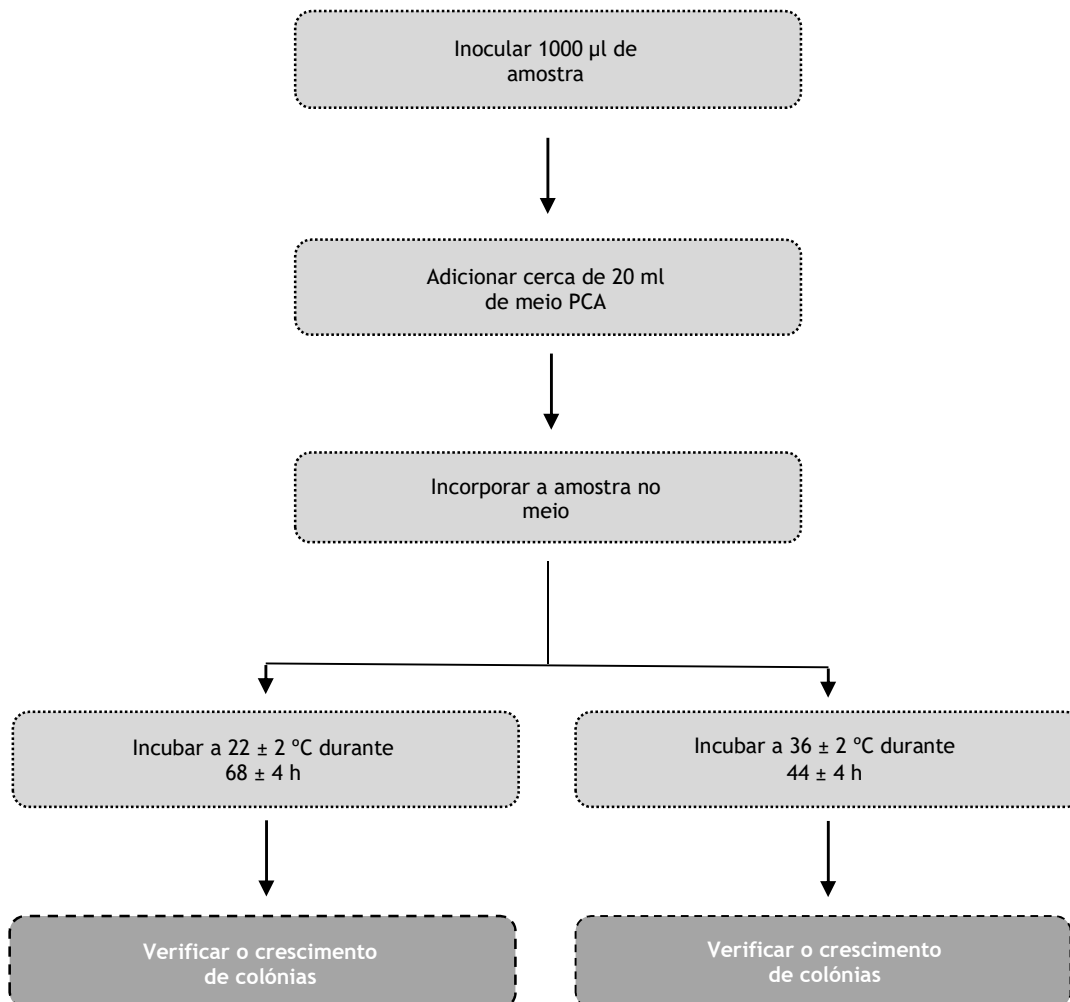
**CERTIFICADO**

*Certifica-se que ...JOÃO... JOSÉ... ANTUNES... PEREIRA...  
participou no Seminário sobre **TRATAMENTOS  
FÍSICOS E FÍSICO-QUÍMICOS EM ÁGUAS  
RESIDUAIS** realizado em LISBOA em 27 de  
Novembro de 1995.*

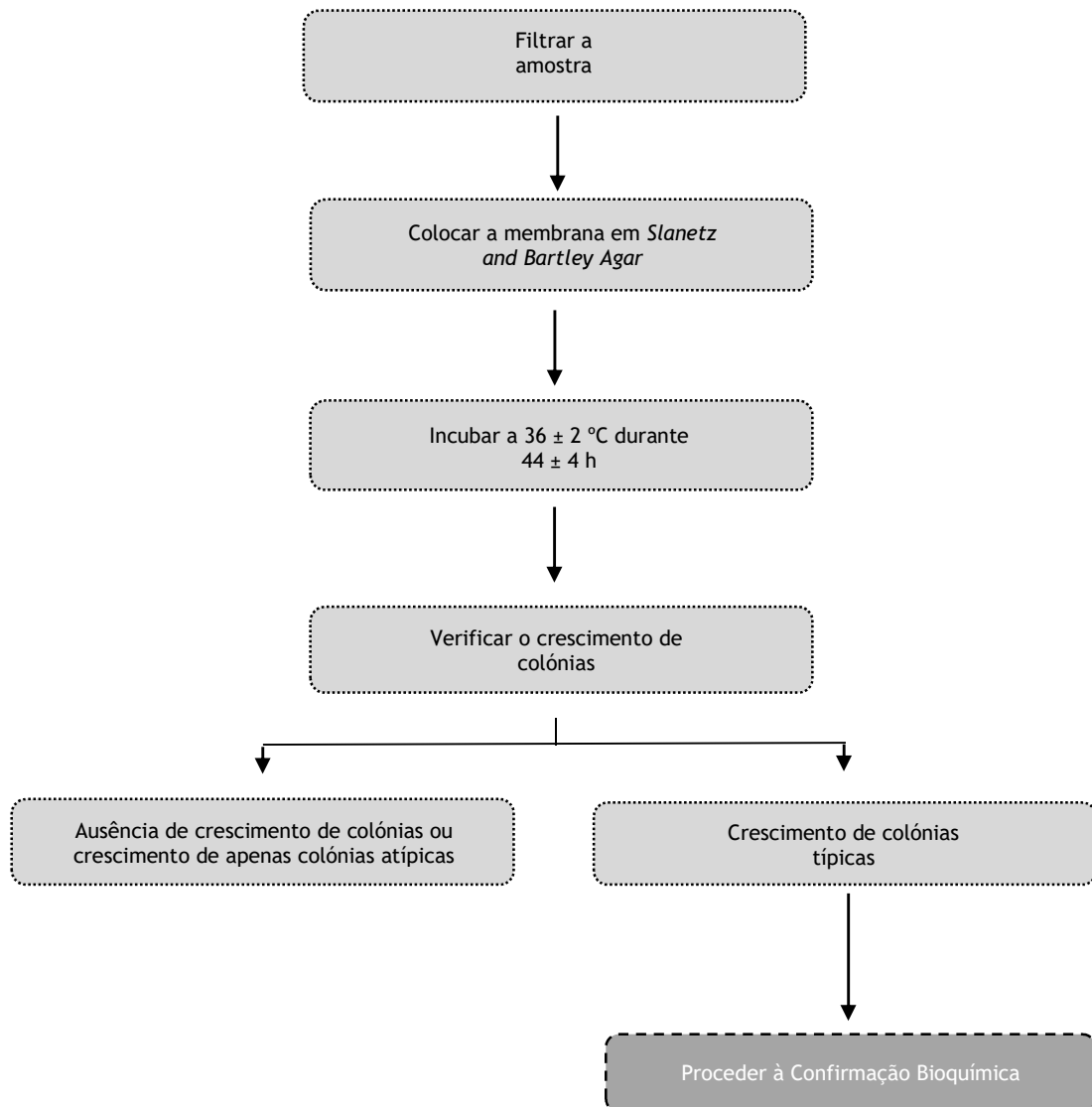


## Anexo B

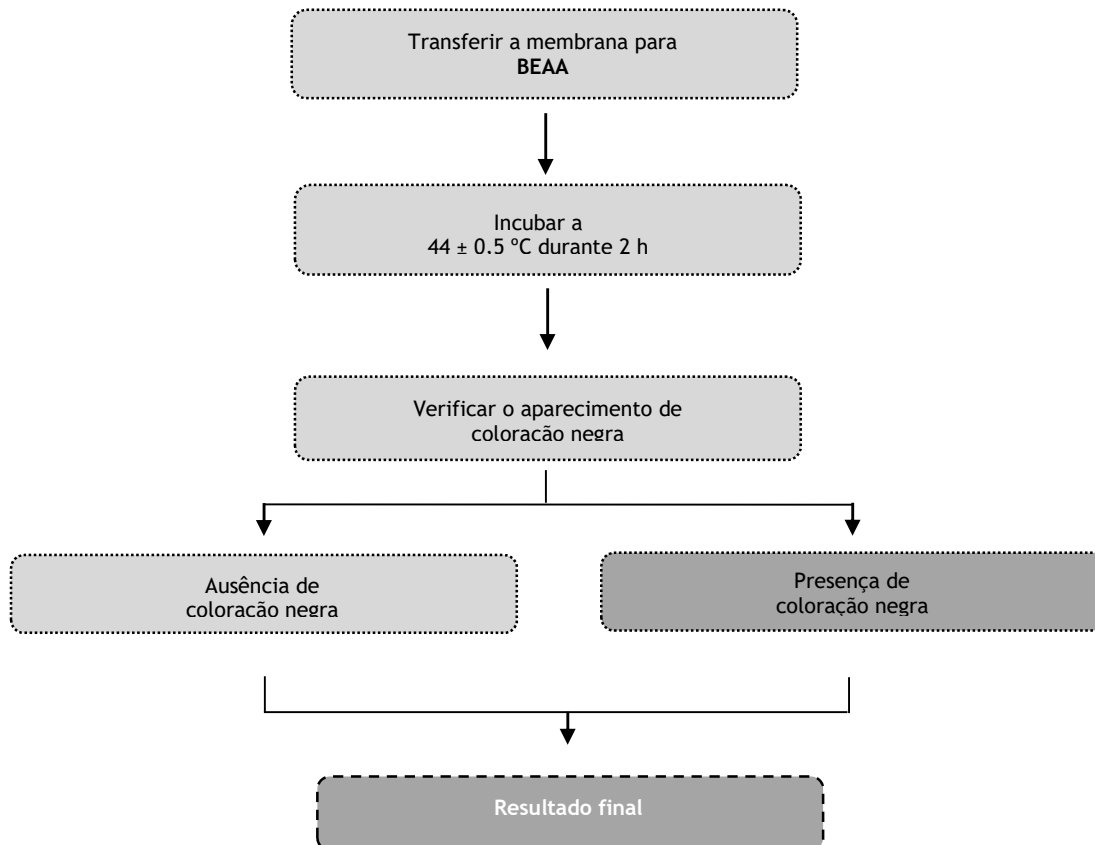
## ANEXO B 1 - Enumeração de microrganismos viáveis - número de colónias a 22 °C e 36 °C - ISO 6222:1999



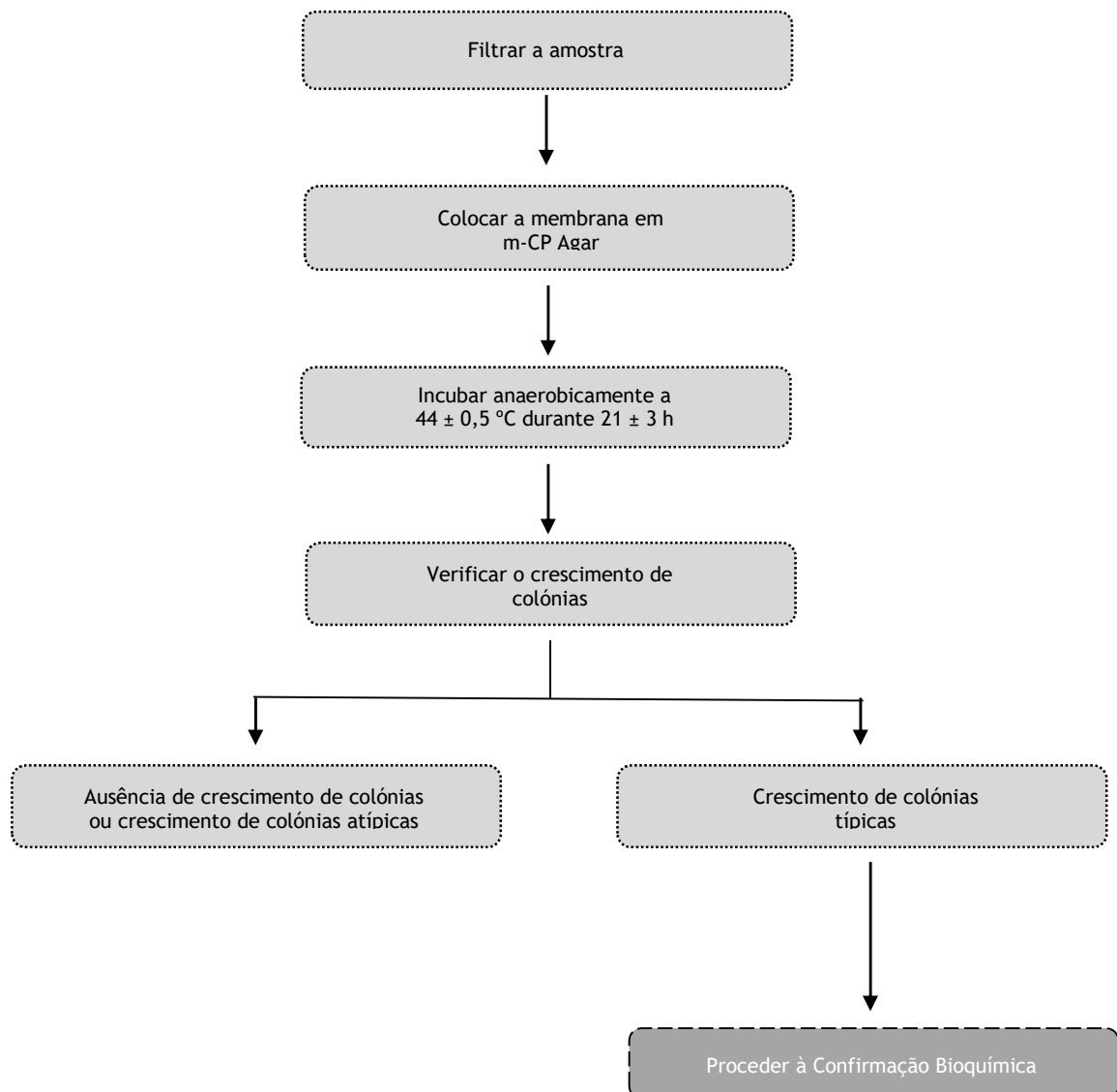
## ANEXO B 2 - Método para pesquisa e quantificação de *Enterococcus* - ISO 7899-2:2000



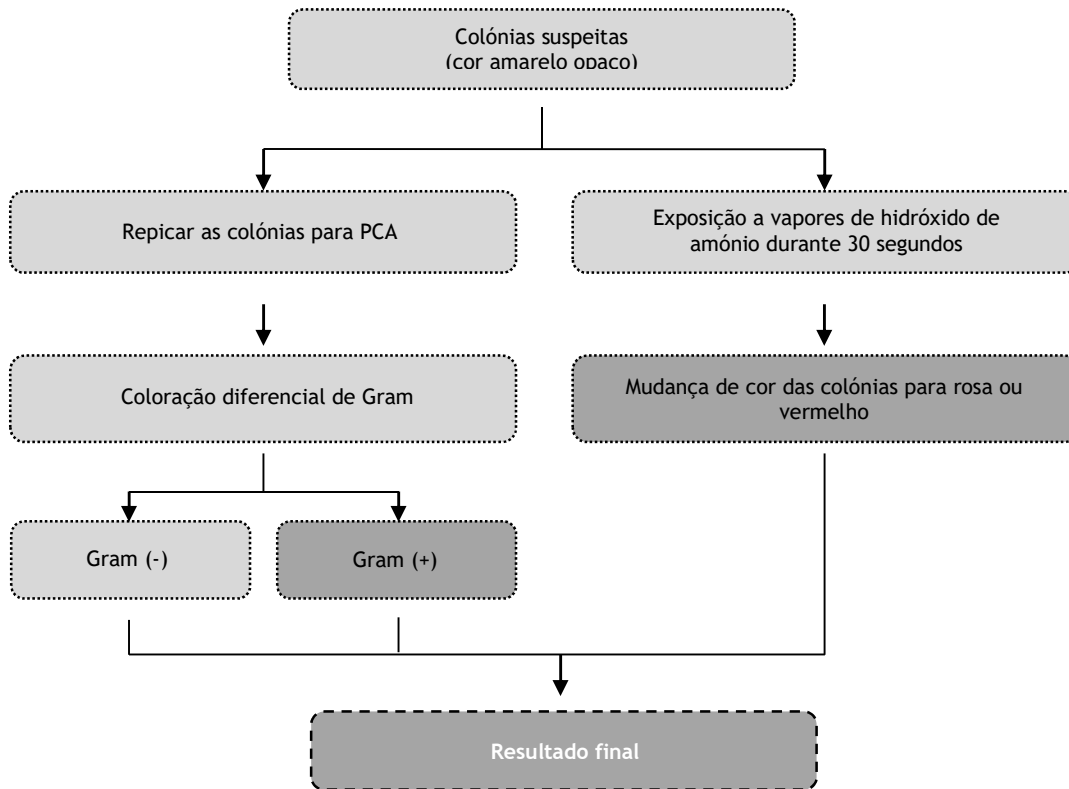
## Confirmação Bioquímica de Enterococos fecais



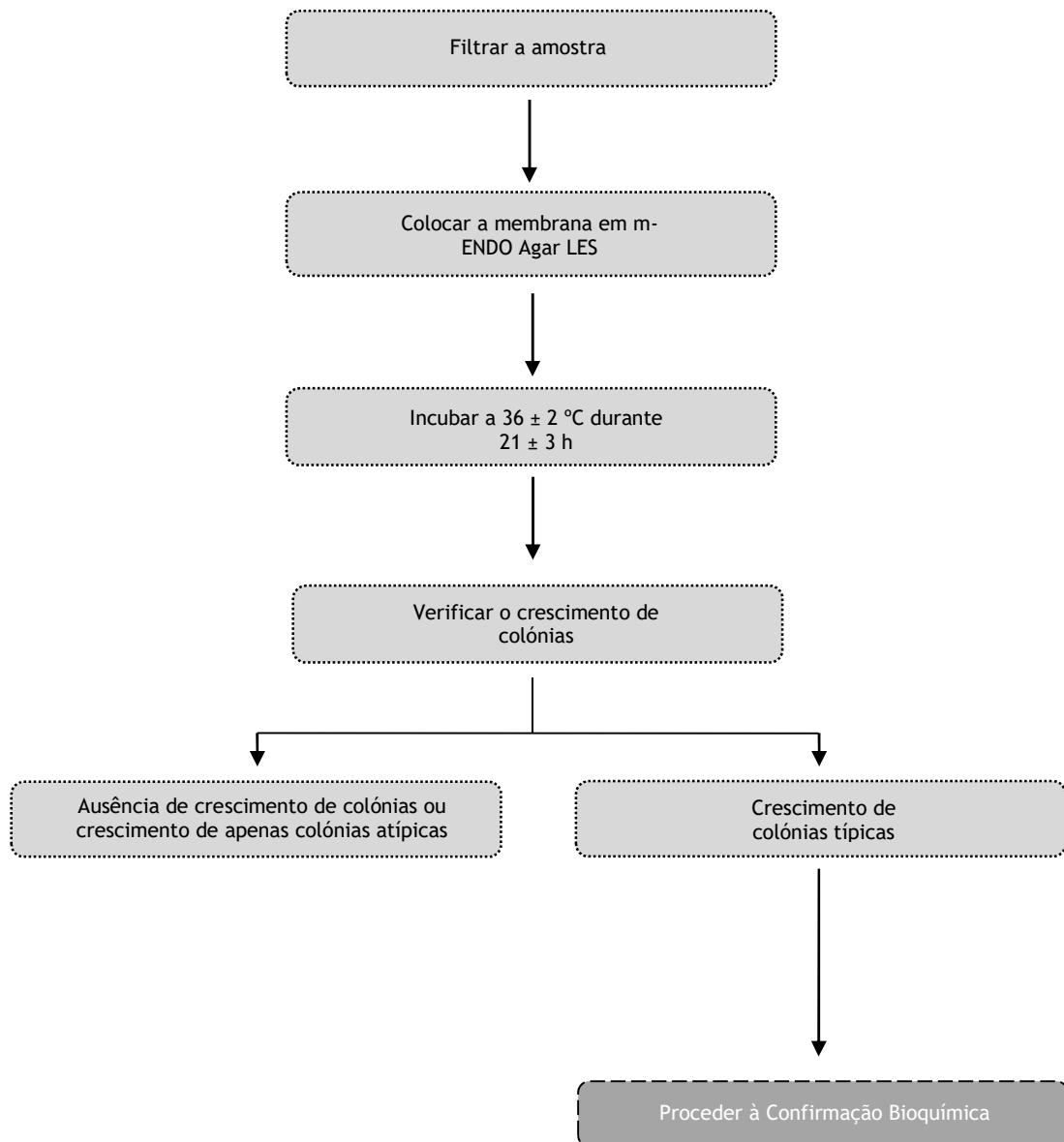
**ANEXO B 3 - Método para contagem e isolamento de *Clostridium perfringens* - Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 para água de consumo humano pelo método de filtração de membrana**



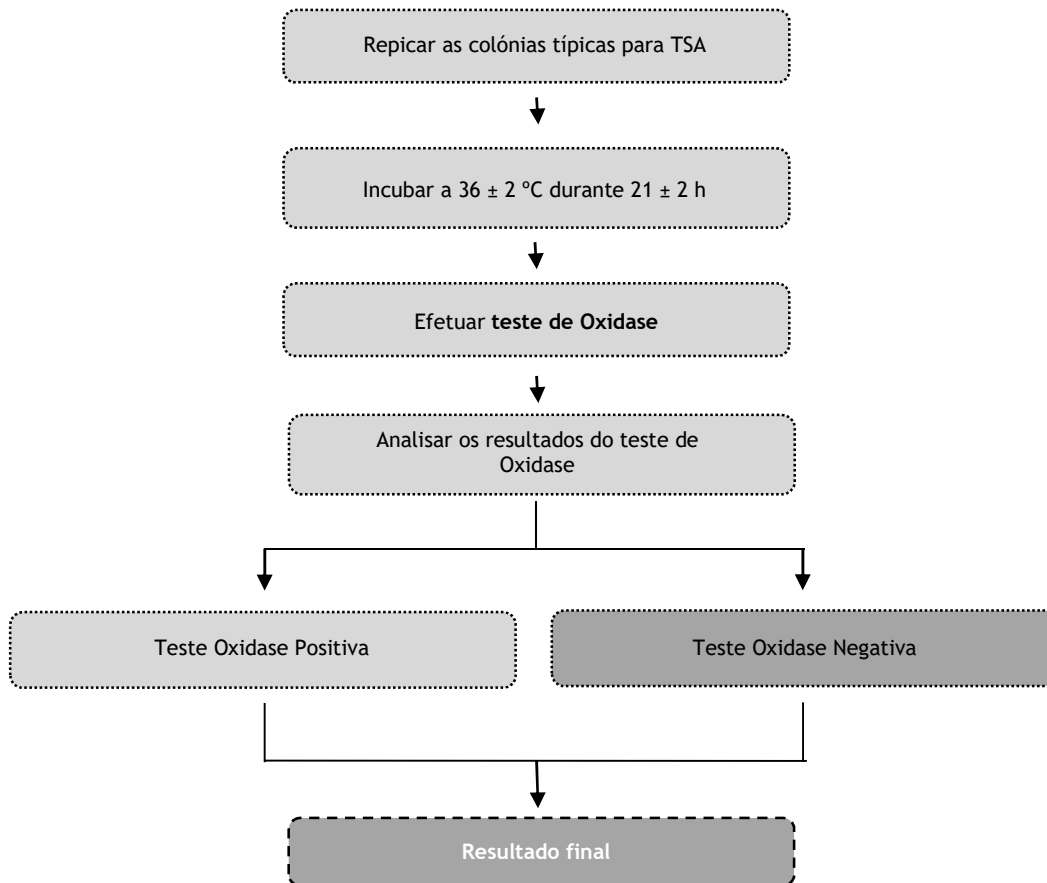
## Confirmação Bioquímica de *Clostridium perfringens*



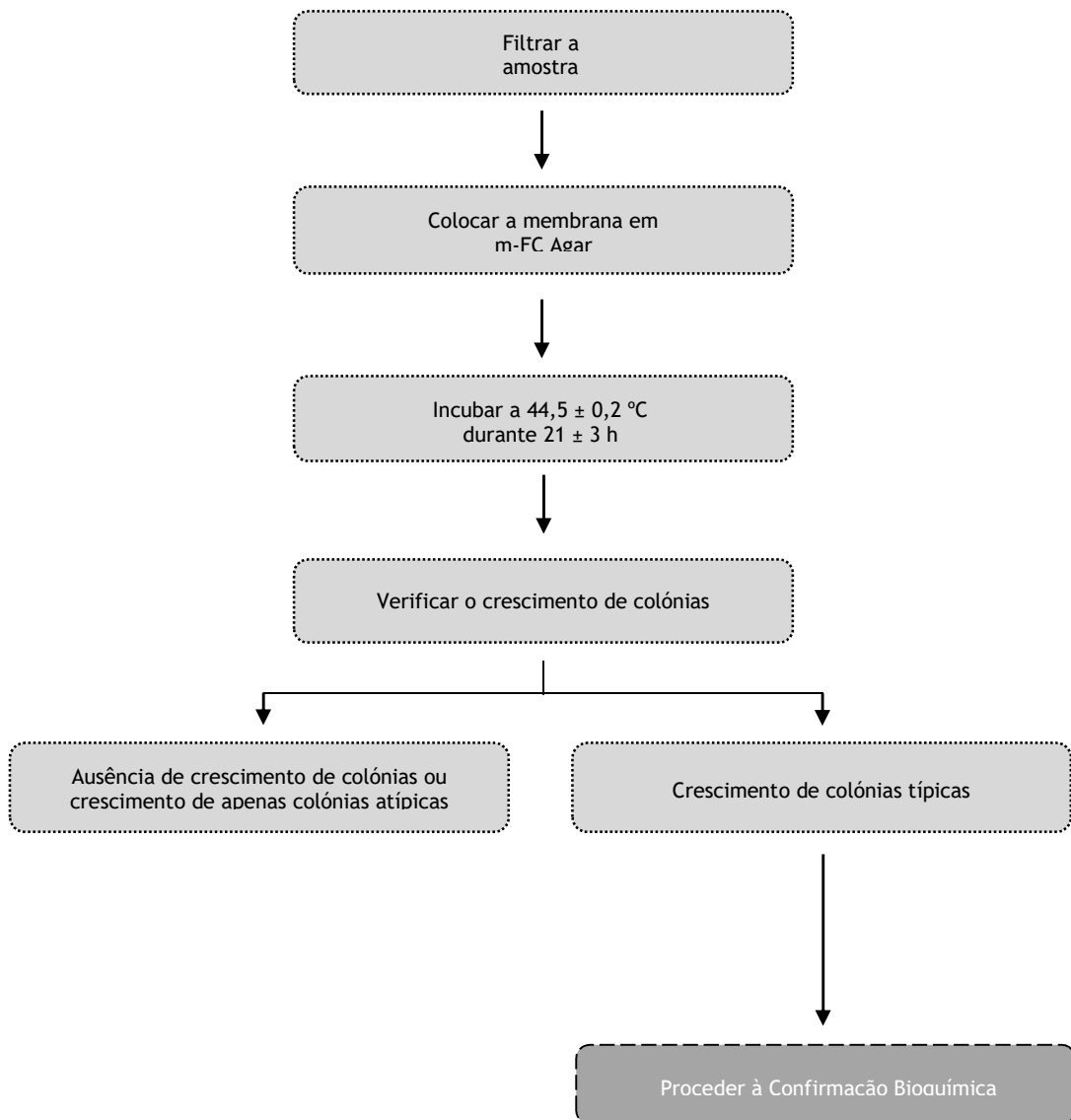
## ANEXO B 4 - Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes - SM 9222 B



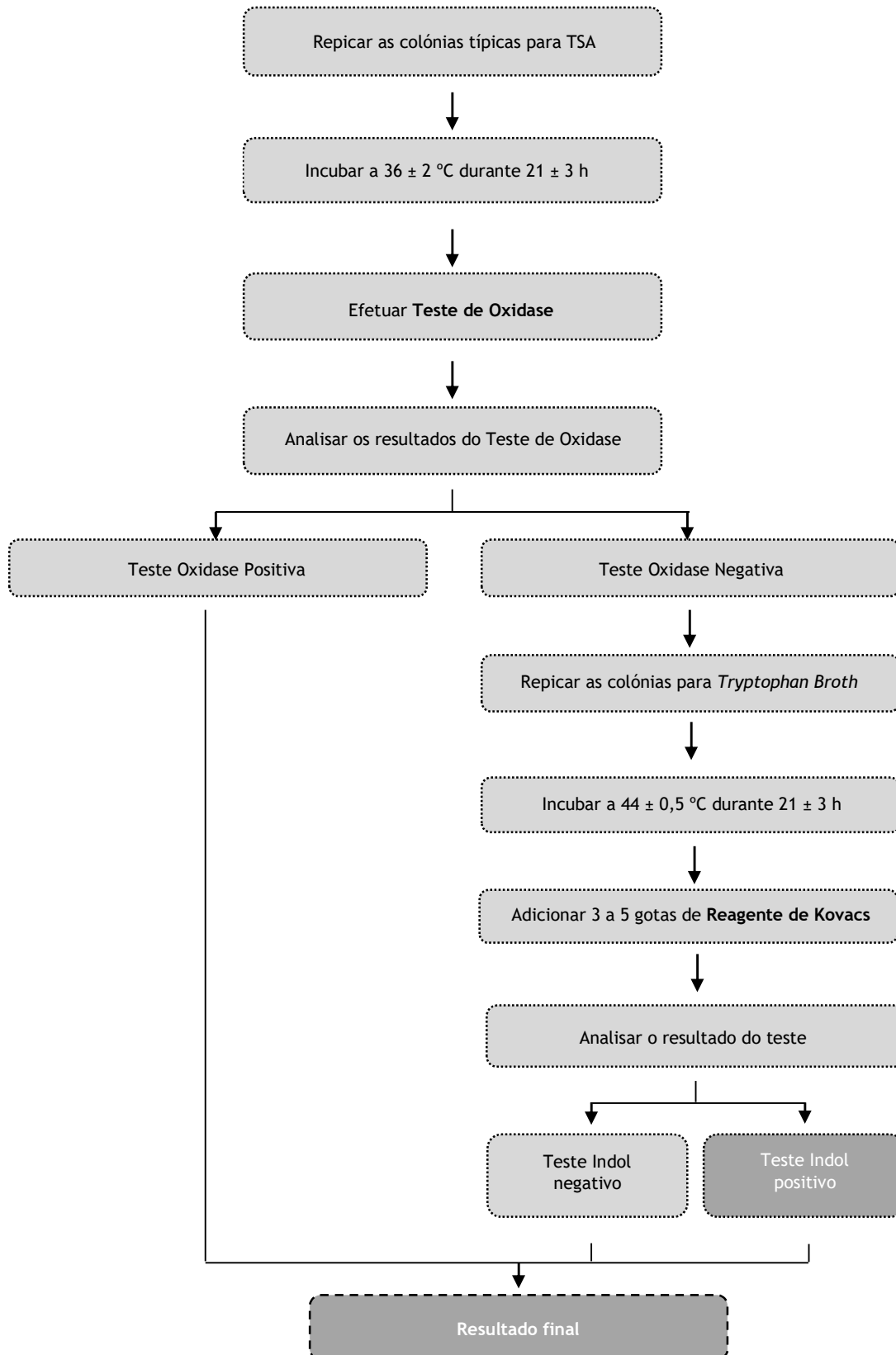
## Confirmação Bioquímica de Bactérias Coliformes



## ANEXO B 5 - Método para pesquisa e quantificação de Bactérias Coliformes Fecais (*Escherichia coli*) - SM 9222 D



## Confirmação Bioquímica de Bactérias Coliformes Fecais (*Escherichia coli*)



## Anexo C

## ANEXO C 1 - Resultados das amostragens efetuadas no ano de 2014 e 2015

Tabela 23 - Qualidade da água nos diversos pontos de amostragem para os parâmetros bacteriológicos exigidos legalmente

Colheita: 20.01.2014						
	Ct <sup>(1)</sup> (N/100 ml)	<i>E. coli</i> (N/100 ml)	Ent. <sup>(2)</sup> (N/100 ml)	Cp <sup>(3)</sup> (N/100 ml)	22 °C (N/ml)	36 °C (N/ml)
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	0	0
3A	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	0	0
Colheita: 17.02.2014						
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	0	0
3E	0	0	0	0	0	0
3C	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	0	0
Colheita: 14.04.2014						
5B	0	0	0	0	0	0
2B	0	0	0	0	0	0
3A	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	0	0
Colheita: 03.06.2014						
6A	0	0	0	0	6	0
3C	0	0	0	0	3	0
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	35	2
Colheita: 30.06.2014						
5B	0	0	0	0	8	7
3A	0	0	0	0	0	0
3D	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	1	3
Colheita: 14.10.2014						
2B	0	0	0	0	1	0
5B	0	0	0	0	>300	>300
3A	0	0	0	0	>300	>300
3D	0	0	0	0	>300	>300
6A	0	0	0	0	5	8

<sup>(1)</sup>Ct: Coliformes totais; <sup>(2)</sup>Ent: Enterococos; <sup>(3)</sup>Cp: *Clostridium perfringens*

**Tabela 24 - Qualidade da água nos diversos pontos de amostragem para os parâmetros bacteriológicos exigidos legalmente (cont.)**

<b>Colheita: 18.11.2014</b>						
	<b>Ct<sup>(1)</sup> (N/100 ml)</b>	<b><i>E. coli</i> (N/100 ml)</b>	<b>Ent.<sup>(2)</sup> (N/100 ml)</b>	<b>Cp<sup>(3)</sup> (N/100 ml)</b>	<b>22 °C (N/ml)</b>	<b>36 °C (N/ml)</b>
2B	0	0	0	0	1	0
5B	0	0	0	0	2	1
3C	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	1	0
<b>Colheita: 09.12.2014</b>						
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	0	1
3E	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	3	0
<b>Colheita: 19.01.2015</b>						
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	1	0
3 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0
3D	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	1	0
<b>Colheita: 30.03.2015</b>						
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	0	0
3C	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	1	0
<b>Colheita: 18.05.2015</b>						
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	1	0
3E	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	2	0
<b>Colheita: 22.06.2015</b>						
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	0	0
3A	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	0	0

<sup>(1)</sup>Ct: Coliformes totais; <sup>(2)</sup>Ent: Enterococos; <sup>(3)</sup>Cp: *Clostridium perfringens*

**Tabela 25 - Qualidade da água nos diversos pontos de amostragem para os parâmetros bacteriológicos exigidos legalmente (cont.)**

<b>Colheita: 20.07.2015</b>						
	<b>Ct<sup>(1)</sup></b> (N/100 ml)	<b><i>E. coli</i></b> (N/100 ml)	<b>Ent.<sup>(2)</sup></b> (N/100 ml)	<b>Cp<sup>(3)</sup></b> (N/100 ml)	<b>22 °C</b> (N/ml)	<b>36 °C</b> (N/ml)
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	1	0
3D	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	0	0
<b>Colheita: 22.09.2015</b>						
2B	0	0	0	0	23	1
5B	0	0	0	0	1	0
3C	0	0	0	0	1	0
6A	0	0	0	0	0	0
<b>Colheita: 26.10.2015</b>						
2B	0	0	0	0	4	34
5B	0	0	0	0	2	1
3E	0	0	0	0	10	0
6A	0	0	0	0	0	0
<b>Colheita: 23.11.2015</b>						
2B	0	0	0	0	1	8
5B	0	0	0	0	1	1
3A	0	0	0	0	1	0
6A	0	0	0	0	0	0
<b>Colheita: 14.12.2015</b>						
2B	0	0	0	0	0	0
5B	0	0	0	0	1	0
3D	0	0	0	0	0	0
6A	0	0	0	0	3	0

<sup>(1)</sup>Ct: Coliformes totais; <sup>(2)</sup>Ent: Enterococos; <sup>(3)</sup>Cp: *Clostridium perfringens*

