

ANÁLISES DE COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. APLICADAS NO ENSINO DE GRADUAÇÃO

CAROLINA DA SILVA GONÇALVES¹; GUILHERME PEREIRA SCHOELER²;
THAYLI ARAÚJO³; LAUREN ANDRADE VIEIRA⁴; ÉRICO KUNDE CORRÊA⁵;
LUCIARA BILHALVA CORRÊA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – carolzitasg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – guilherme.schoeler@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – thayliraraujo@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vieira.lauren@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – ericokundecorrea@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas– luciarabc@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Conforme relata LUNETTA (1991), as aulas práticas podem auxiliar no desenvolvimento de conceitos científicos, além de permitir que os estudantes aprendam como abordar seus conhecimentos teóricos na prática.

Segundo MADIGAN et al. (2010), a microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, os quais podem ser encontrados como células únicas (unicelulares) ou em agrupamentos celulares – exceto os vírus, que são seres acelulares. A Microbiologia tem se mostrado cada vez mais relacionada com questões multidisciplinares como a saúde, higiene e meio ambiente, ultrapassando os limites do ensino superior e dos laboratórios (ANTUNES et al. 2012).

O Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade (NEPERS) da Universidade Federal de Pelotas, atua em diversas áreas de pesquisa, nas quais estão inseridas as análises microbiológicas. O Núcleo conta com a participação de alunos de graduação, pós-graduação e professores.

Dentre as análises microbiológicas realizadas no NEPERS, destacam-se as de contagem de coliformes e detecção de *Salmonella* spp. As técnicas de coliformes, segundo RATTI (2011), são utilizadas para verificação da qualidade da água, pois ela deve estar isenta de microrganismos ou de substâncias químicas que possam prejudicar a saúde humana e ainda, conforme RAY (1996), as duas técnicas destacadas também são empregadas para a detecção quantitativa e qualitativa de microrganismos em alimentos. Pois segundo PELCZAR et al. (1997), eles também podem ser responsáveis por intoxicações e transmitidas por alimentos.

Além disso, FENG (1995) esclarece que esses métodos rápidos também são empregados somente para controle, sendo que resultados negativos são caracterizados como definitivos e resultados positivos são considerados presuntivos e devem ser confirmados por métodos padrões.

A presença de coliformes totais em água e alimentos, em alguns casos, pode não ser indicativa de contaminação fecal, porque participam desse grupo bactérias cuja origem direta não é exclusivamente entérica. Sendo assim, a presença de coliformes totais nesses materiais pode, também, estar relacionada a práticas inadequadas de sanitização (LANDGRAF, 1996). Coliformes fecais ou coliformes termotolerantes são bactérias capazes de desenvolver e/ou fermentar a lactose com produção de gás a 44°C em 24 horas, cuja principal espécie dentro desse grupo é a *Escherichia coli* (BETTEGA, 2006). Segundo RAY (1996), sua

presença em alimentos crus é considerada um indicador de contaminação fecal direta (processamento de matérias-primas de origem animal e falta de higiene no manuseio) ou indireta (através de águas poluídas e de esgoto).

Além das análises de coliformes, o NEPERS também avalia a detecção de *Salmonella* spp. As infecções alimentares originadas de *Salmonella* spp. são enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados com este microrganismo e também pela água (CARDOSO; CARVALHO, 2006). Os principais veículos de transmissão são alimentos de origem animal, principalmente aves e ovos, carne de vaca, peixes, frutos do mar, laticínios como leite e queijos oriundos de leite não pasteurizados, e sorvetes (SHINOHARA et al., 2008).

Este trabalho tem como objetivo apresentar as técnicas utilizadas no NEPERS para contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e detecção de *Salmonella* spp.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho, utiliza como referencial bibliográfico o *Compendium of Methods for Microbiological Examination* (MORTON, 2001). O método do Número Mais Provável (NMP) é empregado na contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes e a metodologia da Contagem em Placas para a detecção de *Salmonella* spp. A partir desses métodos é possível concretizar as referências teóricas para a realização das análises microbiológicas através de atividades práticas no laboratório NEPERS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) indica que todas as práticas laboratoriais que estejam relacionadas ao tratamento microbiológico necessitam de uma bancada limpa e desinfetada, assim como os equipamentos que serão utilizados para garantir a biossegurança. Portanto, antes de iniciar o procedimento analítico é realizada a esterilização dos materiais em autoclave por 15 minutos.

No preparo das diluições para a prática de contagem de coliformes, 25 g da amostra é pesada e homogeneizada em 225 mL de água peptonada (H₂O_p) (10⁰). Após a homogeneização da amostra, uma alíquota de 1mL é retirada e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de diluente (H₂O_p) (10⁻¹), e a amostra é homogeneizada em aparelho vórtex. Da mesma forma para todos as diluições seguintes.

Para os coliformes totais realiza-se o teste presuntivo, onde se selecionam as três maiores diluições consecutivas obtidas durante o teste anterior. Com auxílio de pipeta estéril, inocula-se 1 mL das diluições em cada amostra em uma série de três tubos de Durham contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), que permite a fermentação realizada por esse tipo de microrganismo. Após, os tubos são levados à estufa para incubação à 35°C por 24 horas. Posteriormente, observa-se a formação de gás nos tubos, que caracteriza a positividade do teste. Os tubos que apresentam resultado negativo à formação de gás são submetidos à incubação por mais 24 horas, e os positivos são encaminhados para realização do teste confirmativo, como também é explicado por HAJDENWURCEL (1998). Para cada tubo positivo, uma alçada de amostra é retirada e transferida para o

tubo contendo Verde Brilhante (VB) e incubado por 24 horas a 35°C. A partir de cada tubo positivo no VB, é realizada a análise para coliformes termotolerantes, retirando-se uma alçada de amostra para um tubo de ensaio contendo caldo *Escheria coli* (EC), sendo incubado por 24 horas a uma temperatura de 45,5°C. Cada tubo com caldo EC que apresentar formação de gás é considerado positivo para coliformes termotolerantes. Uma alçada da amostra é retirada do tubo e transferida para uma placa de petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), sendo incubada à 35 °C por 24 horas. Havendo o crescimento de colônias típicas (nucleadas, com centro preto, com ou sem brilho metálico), duas são retiradas da placa e transferidas para tubos contendo Ágar PCA inclinado modificado e incubas à 35°C por 24 horas, para obtenção de colônias mais puras. Por fim, com o resultado das colônias puras, procede-se o Teste Bioquímico (IMVC) e Morfológico através da Coloração de GRAM. As colônias purificadas são transferidas para tubos contendo Caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer (VM-VP) e Citrato. O teste bioquímico de Citrato é realizado. Conforme SILVA et al. (2007), o mesmo caracteriza-se por verificar se a bactéria é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono para crescimento.

Na detecção de *Salmonella* spp. 1mL de amostra é transferida para tubo com 9 mL de Caldo Lactosado a fim de realizar as diluições subsequentes. Esses tubos são incubados por 12 horas, em um período denominado “overnight” à uma temperatura de 35°C. O enriquecimento seletivo, explicado por PAIVA et al. (2006) é a etapa que deve auxiliar no desenvolvimento e recuperação da bactéria paralelamente, onde devem prevenir o desenvolvimento de microrganismos competidores. O mesmo é realizado transferindo-se 1mL da amostra para um tubo com 5 mL de Caldo tetrationato (TT) e mais 1 mL para outro tubo contendo 5 mL de Caldo Selenito Cistina (SC). Ambos são incubados por 24 à 35°C. Após a incubação, realiza-se o plaqueamento diferencial, transferindo-se uma alçada da amostra imersa em caldo TT para uma placa contendo Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), Ágar Entérico Hecktoen (HE) e Ágar Bismuto Sulfito (BS). Repete-se o procedimento com o Caldo SC. Incubam-se as placas de forma invertida por 24 horas à 35°C. A partir da formação de colônias típicas e atípicas uma porção de biomassa do centro de cada colônia é removida com o auxílio de uma agulha de inoculação e a mesma é feita em dois tubos de Ágar Tríplice Açúcar-Ferro (tubos inclinados), sendo incubados por 24 horas à 35°C. Com a formação das colônias puras, procedem-se os testes morfológico e bioquímico. O morfológico por meio da Coloração de GRAM, e bioquímico, como fermentação de carboidratos (dulcitol, sacarose, lactose), Caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer (VM-VP), Citrato e Urease.

4. CONCLUSÕES

Pode-se constatar que as práticas realizadas em laboratório, através das análises microbiológicas, esclarecem os conhecimentos teóricos. Assim como, por meio das técnicas utilizadas verifica-se a importância da utilização desses parâmetros microbiológicos para a avaliação higiênico-sanitária de água e alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, C.H.; PILEGGI, M.; PAZDA, A.K. Porque a visão científica da microbiologia não tem o mesmo foco na percepção da microbiologia no ensino médio? In: **III SIMPÓSIO NACIONAL DE ENSINO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**, Ponta Grossa, 2012, **Anais III Simpósio Nacional de Ensino de Ciências e Tecnologia**. Ponta Grossa, 2012.
- BETTEGA, J. M. P. R.; MACHADO, M. R.; PRESIBELLA, M.; BANISKI, G.; BARBOSA, C.A. Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.5, p. 950-954, 2006.
- BRASIL – ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Salvador: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella spp.* **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 95–101, 2006.
- FENG, P. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1995. v.1.
- HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Comunicações e Editora, 1998.
- LANDGRAF, M. Microrganismos Indicadores. **Microbiologia dos alimentos**, São Paulo: Atheneu, 1996.
- LUNETTA, V. N. Atividades práticas no ensino da Ciência. **Revista Portuguesa de Educação**, Braga, v.2, n.1, p. 81-90, 1991.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MORTON, R. D. **Compendium of Methods for Microbiological Examination**. Whashington: APHA, 2001.
- PAIVA, J.B.; STERZO, E.V.; RIBEIRO, S.A.; PEREIRA, E.A.; JUNIOR, A.B. Isolamento de *Salmonella*: Comparação das etapas de pré-enriquecimento enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.3, p.263-269, 2006.
- PELCZAR, JR.M.J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: McGraw-Hill, 1997.
- RATTI, B.A; BRUSTOLIN, C.F; SIQUEIRA, T.A; TORQUATO, A.S. Pesquisa de coliformes totais e fecais em amostras de água coletadas no bairro zona sete, na cidade de Maringá-PR. In: **VII ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA**, Maringá, 2011, **Anais VII Encontro Nacional de Produção Científica**. Maringá: Centro Universitário de Maringá
- RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 1996.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella spp.*, importante agente patógeno veiculado em alimentos. **Revista Ciências & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H; SANTOS, R.F.S; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Logomarca Varela, 2007.