

IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DE LINHAGEM BACTERIANA E SEU USO EM ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA DURANTE PROCESSO DE COCÇÃO DE FRANGO

Géssica Simon*

Henrique Heckler Comunello*

Lisiane Aparecida Zuconelli*

Lucas Novello*

Jane Mary Lafayette Neves Gelinski**

Resumo

O objetivo deste estudo deu-se a partir de desafio aos estudantes para a identificação de uma cultura bacteriana e utilização em experimento a ser planejado posteriormente. Foi recebida uma linhagem pura e liofilizada não identificada para que, a partir de seu cultivo em ágar e testes bioquímicos fosse possível chegar a uma definição ao menos do gênero bacteriano. A cultura recebida tratava-se de uma linhagem de referência ATCC, mas foi fornecida sem identificação. Foram realizadas análises de identificação morfofisiológica e de cultivo bacteriano em meios de cultura em caldo e em ágar. A segunda etapa foi a realização de experimento usando a cultura identificada. Amostras de frango cru foram utilizadas para avaliar a sobrevivência do microrganismo em diferentes temperaturas durante processo de cocção. Uma das amostras foi inoculada com *Pseudomonas* e a outra sem inóculo, como grupo controle. Verificou-se que a fase de declínio (morte) do microrganismo ocorreu entre 75°C e 90°C de cocção do frango. Portanto, há necessidade de procedimentos de controle que visem à redução dos índices de contaminação de qualquer tipo de microrganismo patogênico em alimentos, porque isso reduz riscos à saúde do consumidor.

Palavras-chave: *Pseudomonas*. Frango. Cocção. Bioquímica. Patógeno.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente são realizadas diversas pesquisas para a detecção de microrganismos que sejam contaminantes ou ativos em processos ou produtos. Liofilização é um processo de estabilização, no qual substâncias ou microrganismos são previamente congelados, havendo redução da quantidade de diluente, primeiro por sublimação e posteriormente por dessecção, para valores tais que impeçam atividade biológica e reações químicas; passam, portanto, pelos processos de congelamento inicial, secagem primária e secagem secundária (MARQUES, 2008).

O processo de liofilização se mostra eficiente comparado com outros meios de desidratação, frente a características como decomposição térmica, ações enzimáticas e desnaturação de proteínas, entre outros (GARCIA, 2009). Culturas microbianas liofilizadas são úteis para estudos básicos e aplicados, para utilização comercial com diversos fins, principalmente na área de alimentos. Culturas bem identificadas podem constituir coleções microbianas de referência, tais como a American Type Culture Collection (ATCC), entre outras coleções de referência.

Na rotina laboratorial são utilizados certos testes chaves para reduzir o trabalho de identificação de bactérias, o custo e abreviar o tempo requerido para diagnóstico.

Na área de alimentos, são desenvolvidos diversos produtos que seguem uma legislação quanto à qualidade microbiológica (BRASIL, 2001); isso é necessário para que ao comprar o alimento ele possa atingir todas as expectativas sensoriais do consumidor. Devido suas características intrínsecas, tais como alta atividade de água, elevado valor nutricional e pH próximo à neutralidade, a carne de frango constitui um ótimo meio para o desenvolvimento de microrganismos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

A Legislação Brasileira não exige uma análise para presença de *Pseudomonas aeruginosa*, porém a Resolução RDC nº 12 estabelece ausência destes microrganismos em 100mL de água envasada para o

preparo de alimentos infantis, imunossuprimidos e imunocomprometidos, assim como para dietas enterais (BRASIL, 2001).

Este trabalho teve como objetivo identificar a cultura liofilizada e, quando colocada em contato com o frango, seria eliminada por ação da temperatura, uma vez que a legislação não determina um trabalho já esteja contaminado, somente determina que não tenha nenhuma contaminação ou prevenir a mesma.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado como prática pedagógica laboratorial durante realização de parte do componente curricular Microbiologia II do Curso de Bacharelado em Biotecnologia Industrial (3ª fase) no período de 30 dias. Portanto, trata-se de um estudo de caráter experimental relacionado a aprendizagem em técnicas básicas em microbiologia, sob a supervisão da professora orientadora do componente curricular. As atividades seguiram além do cronograma de aulas prestabelecidas, ou seja com dedicação extra de tempo do grupo envolvido na prática.

A reativação de uma amostra de linhagem bacteriana liofilizada foi realizada em caldos BHI (infuso de cérebro e coração) e TSB (caldo triptico de soja), incubados em estufa bacteriológica a 37°C/48 horas. Após, realizou-se a semeadura dessas culturas em placas de Petri contendo Ágar Sangue para crescimento. Para uma avaliação fenotípica preliminar da cultura em estudo, foi realizada a coloração de Gram. Repiques em placas de Petri com Ágar BHI foram realizados para que os testes de identificação microbiana pudessem ser efetuados com culturas frescas. O primeiro foi o teste de Catalase com a adição de uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. Os tubos que continham o microrganismo apresentaram pigmentação esverdeada, podendo ser uma contaminação, e, após ser realizada outra reativação, percebeu-se que essa pigmentação é uma característica da bactéria em estudo.

No teste de fermentação, uma pequena quantidade de cultura foi distribuída em tubos de ensaio contendo caldo Triptona (Synth) com glicose e tubinhos Durham invertidos. Os tubos foram incubados a 28 °C por 72 horas, e após esse período averiguou-se a ausência da formação de gás. Havendo divergências nos resultados, um novo teste de coloração de Gram. Para a prova de Indol, foram adicionadas algumas gotas do reativo de Kovacs no tubo de ensaio com o microrganismo, sendo resultado negativo a ausência de aparição do anel com coloração vermelha na superfície do meio e, positivo, anel vermelho.

A sensibilidade dos microrganismos frente aos antibióticos foi avaliada por meio do método de difusão em disco, onde, uma suspensão bacteriana de turbidez equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5 foi inoculada, utilizando swab, sobre toda a superfície da placa de Petri contendo Agar Mueller-Hinton (Kasvi). Após isso, com o auxílio de uma pinça estéril, foram sobrepostos os discos contendo os seguintes antibióticos: amoxicilina + clavulanato (30µg), ampicilina (10µg), amicacina (30µg), ceftazidima (30µg), meropenem (10µg), cefalotina (30µg), cefuroxima (30µg), cefoxitina (30µg), cefepime (30µg), sulfametoxazol-trimetropim (25µg), ciproflaxina (05 µg) e gentamicina (10 µg). Após 24 horas de incubação na estufa a 28°C, os halos de inibição foram medidos em mm e comparados com os dados da tabela fornecida pela professora.

O efeito de cada antibiótico sobre a bactéria foi classificado como sensível, intermediário ou resistente conforme ilustrado na Tabela 1. A conservação desse microrganismo a médio prazo, se deu por meio de esgotamento em estrias em tubos inclinados contendo Ágar Nutrientes e colocados sob refrigeração (7 a 10°C). Utilizou-se também, o método de congelamento, onde amostras da cultura foram colocadas em criotubos contendo 1.600 µL de caldo BHI e 400 µL de glicerol e colocadas em freezer a uma temperatura de -20°C até a sua utilização.

Para o teste de controle de temperatura de sobrevivência em frango sob cocção, foi realizada novamente a reativação da bactéria e inoculada em duas amostras com 25 gramas de peito de frango e 225 mL de água

peptonada a 0,1% e uma outra amostra de frango para controle, sem inóculo. Essas amostras foram aquecidas e submetidas a variadas temperaturas a fim de verificar o crescimento bacteriano conforme tempo e temperatura. Alíquotas destes inóculos foram retiradas nas temperaturas 35°C, 50°C, 60°C, 75°C e 90°C e semeadas em placas de Petri contendo Ágar Base *Pseudomonas* após a diluição decimal seriada das mesmas. Após serem incubadas a estufa por 24 horas foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, o microrganismo recebido se tratava da *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno aeróbico obrigatório com forma de bastonete gram-negativo que forma colônias redondas e lisas de coloração esverdeada fluorescente.

Os esfregaços das colônias, após serem corados pelo método de Gram foram analisados por microscopia óptica de luz, constatando-se que a cultura não apresentou coloração que evidenciasse a forma e tipo de agrupamento do microrganismo. Contudo, através das divergências nos resultados dos demais testes, realizou-se nova análise de Gram para verificação. A bactéria foi então identificada como sendo bacilo Gram negativo (Figura 1A, B). É oxidase positiva e não fermenta carboidratos e sim, oxida a glicose. (BROOKS, 2014). Uma de suas principais características é a capacidade de formar biofilmes. Os caldos de BHI e TSB usados para a reativação do microrganismo liofilizado apresentaram pigmentação esverdeada apresentando também fluorescência sob luz UV (Figuras 1) bem como em ágar *Pseudomonas* e ágar sangue (Figuras 3, 4). A respeito disso, Brooks e outros (2014) afirmam também, que esse microrganismo cresce facilmente em muitos tipos de meio de cultura, produzindo, às vezes um odor adocicado ou semelhante ao de uva ou milho. Algumas cepas hemolisam o sangue e há a formação de colônias lisas e redondas de coloração esverdeada fluorescente.

Os resultados dos testes bioquímicos com a cultura mostraram que o microrganismo é catalase positiva, havendo a formação de bolhas de ar, Indol negativo e não formador de gás, classificando-se como não fermentadora. Os bacilos Gram-negativos classificados como não fermentadores de glicose, são aeróbios, não esporulam e são incapazes de utilizar a glicose como fonte de energia via processo de fermentação, degradando-a pela via oxidativa (BRZEZINSKI et al., 2017). Siqueira (2002) afirma que, "Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria móvel, em forma de bastonete, medindo cerca de 0,6 x 2,0 µm. É Gram-negativa e ocorre como bactéria isolada, em pares e, em certas ocasiões, em cadeias curtas [...]". Sendo que maioria é oxidase positiva e móvel. Esse microrganismo é o mais frequente bacilo Gram-negativo não fermentador ubíquo, raramente associado a patologias em indivíduos saudáveis, entretanto, atualmente é considerada como uma das principais causas de infecções oportunistas, principalmente relacionada a queimaduras, fibrose cística, bronquite crônica, infecções do trato urinário e infecções hospitalares (SOUZA et al., 2016). É encontrada no solo, na água, nos vegetais, nos animais, nos alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares (ALTERTHUN, 2017).

A sensibilidade da cultura frente a alguns antibióticos foi analisada através do teste de antibiograma. A bactéria mostrou-se sensível a seis dos doze antimicrobianos testados apresentando resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina, cefalotina, cefuroxima, amoxicilina + clavulanato, cefoxitina e sulfametoxazol-trimetropim (Tabela 1).

Em geral, os bacilos Gram negativos não fermentadores apresentam uma alta resistência aos antimicrobianos. Os principais mecanismos de resistência nesta espécie são a produção de β -lactamases e enzimas que modificam os aminoglicosídeos (ALTERTHUN, 2017). Segundo Silva Júnior e outros (2014) isolados de *P. aeruginosa* que apresentam um amplo espectro de resistência têm sido frequentes. Exibem baixa sensibilidade a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem).

O mecanismo de resistência desta bactéria aos β -lactâmicos é a produção de β -lactamase de amplo espectro ou induzíveis do tipo AmpC (cuja indução é provocada por cefalosporinas de 1ª a 2ª geração e ampicilina). Em relação à resistência ao trimetoprim, essa ocorre principalmente devido ao sistema de efluxo presente na membrana, que reduz a penetração do fármaco e impede a interação com seu sítio-alvo (SOUZA et al. 2016).

A resistência cruzada a antimicrobianos também é uma das características marcantes dessa espécie. Trata-se da presença de múltiplos mecanismos de resistência presentes num único hospedeiro que resiste a diversos fármacos. A baixa permeabilidade de sua membrana externa tem sido o elemento chave para explicar essa resistência natural (SILVA JUNIOR, 2014).

Em relação aos testes para avaliação da sobrevivência do microorganismo durante cocção do frango, verificou-se que a temperatura ótima com maior recuperação (sobrevivência) ficou na faixa de 35°C a 45°C e a fase de declínio se iniciando após os 60°C, conforme ilustrado na Tabela 2. A amostra de frango sem o inóculo do microorganismo não apresentou crescimento microbiano. Portanto, as amostras estavam livres do patógeno. Nos alimentos, mais especificamente na carne de frango, *Pseudomonas* é o principal microorganismo relacionado à deterioração da carne (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

A Legislação Brasileira não exige análise para a presença de *Pseudomonas* em alimentos, porém é de extrema importância que se tenha um controle microbiológico a fim de se evitar problemas que possam acarretar danos à saúde do consumidor

3 CONCLUSÃO

Pode-se afirmar então, que a liofilização de qualquer microorganismo é extremamente útil, viável e adequada para diversos estudos em microbiologia. Observou-se que a fase de morte do microorganismo

Pseudomonas acontece entre as temperaturas de 75°C a 90°C. Sendo assim, microrganismos deste grupo podem ser eliminados durante o cozimento da carne de frango (acima de 75°C).

Dessa forma, verifica-se a necessidade de procedimentos de controle que visem à redução dos índices de contaminação de qualquer tipo de microrganismo patógeno presente nos alimentos com intuito de reduzir os danos à saúde do consumidor.

Além disso, é necessário que se tenha mais pesquisas específicas para *Pseudomonas aeruginosa* e que a sociedade tenha mais conhecimento da mesma devido sua presença nos alimentos e hospitais, a fim de diminuir sua incidência no meio.

REFERÊNCIAS

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 3029, de 20 de dezembro de 2000. Resolução-rdc Nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Brasília, 02 jan. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15fddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 15 jun. 2018.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. 2014. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2018.

BROOKS, Geo F. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014, 864 p.

BRZEZINSKI, L,S et al. Incidência de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose isolados de .hemoculturas de pacientes oncológicos. Caderno da Escola de Saúde. Curitiba. v.17. n.1, 2017.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. Microbiologia de los alimentos. 4. ed. Zaragoza: Editora Acribia, 1993.

GARCIA, L. P. Liofilização aplicada a alimentos. 2009. 45f. Trabalho Acadêmico (Graduação Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2009.

MARQUES, L. G. Liofilização de frutas tropicais. 2008. 255p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2008.

PELCZAR, Michael Joseph,; CHAN, Eddie Chin Sun,; KRIEG, Noel R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

RALTERTHUN, Trabulsi. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2017. 888 p.

SILVA JÚNIOR, S, de A. Perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água superficial e efluente hospitalar: teste de sensibilidade a antimicrobianos e detecção de metalo- β -lactamase. Revista Brasileira de Pesquisa e Saúde. Vitória. p. 97-104. Out/Dez. 2014.

SIQUEIRA, Fernanda Sant'Ana de. Mecanismos de resistência a β -Lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. Revista do Biomédico. Julho/Agosto 2002. Disponível em: <<http://www.crbm1.gov.br/bio48/rev24.asp>> . Acesso em: 15 jun. 2018.

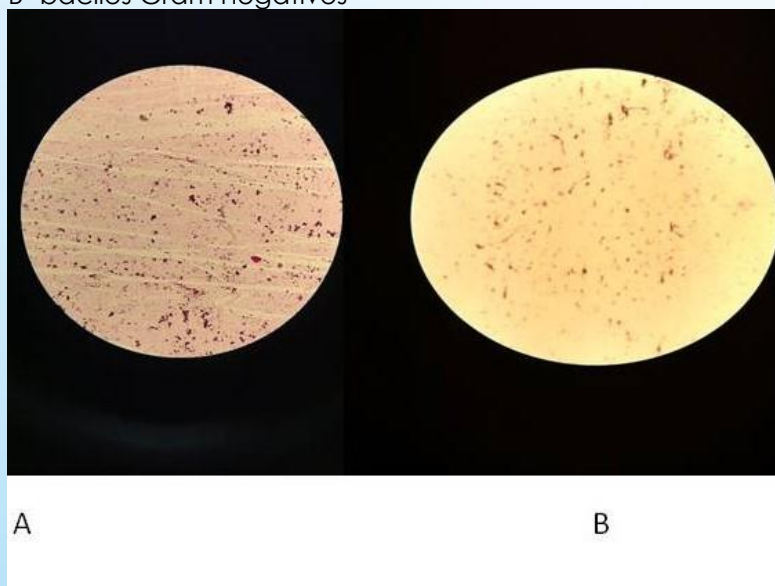
SOUZA, Gustavo Henrique Bianco de et al. *Pseudomonas aeruginosa* em hospital da microrregião de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil . Infarma – Ciências Farmacêuticas, v. 28. p 234-240. 2016.

Sobre o(s) autor(es)

*Discentes curso bacharelado em Biotecnologia Industrial - Unoesc Videira, SC. E-mails: gessica.simon@gmail.com; lisianezuconelli@gmail.com; henriquecomunello@hotmail.com; luk36@live.com

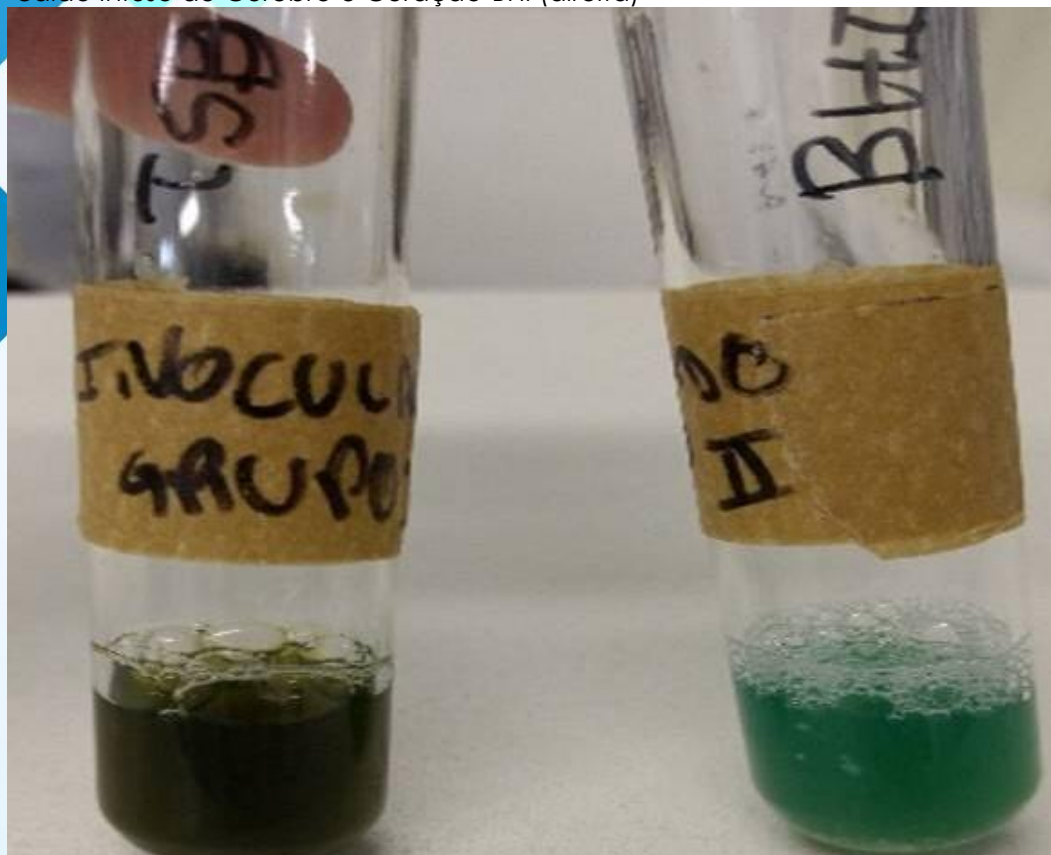
**Professora orientadora - componente curricular Microbiologia II - curso bacharelado em Biotecnologia Industrial, Unoesc Videira.

Figura 1 - Caracterização morfológica e de coloração de Gram de cultura de *Pseudomonas* a partir de cultivo em ágar *Pseudomonas*. A-sem definição; B- bacilos Gram negativos



Fonte: Os autores (2018).

Figura 2 - Cultivo de Pseudomonas em caldo Tríplico de Soja-TSB (esquerda) e caldo Infuso de Cérebro e Coração-BHI (direita)



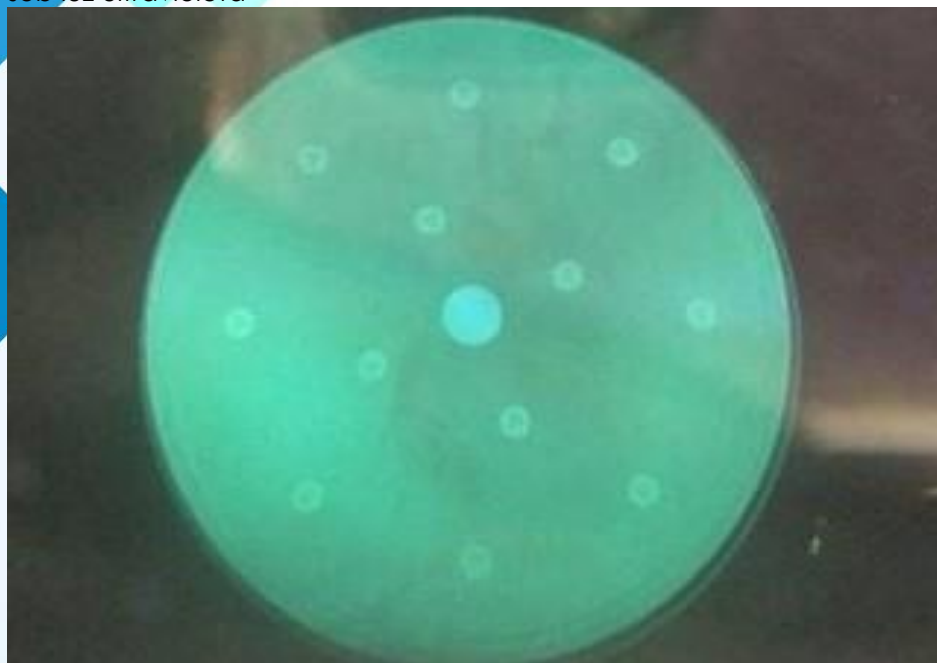
Fonte: Os autores (2018).

Figura 3 - Cultura de Pseudomonas em ágar sangue evidenciando pigmentação esverdeada



Fonte: Os autores (2018).

Figura 4 - Teste antibiograma com cultura de *Pseudomonas* apresentando crescimento em toda a placa, com coloração esverdeada e fluorescência sob luz ultravioleta



Fonte: Os autores (2018)

Tabela 1 - Resultado de teste antibiograma de sensibilidade da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* (R=Resistência; I=Intermediária; S=Sensível)

Antibiótico	Tamanho halos (mm)	R	I	S
Amicacina (30 µg)	31			X
Amoxicilina + clavulanato (30 µg)	0	X		
Ampicilina (10 µg)	0	X		
Cefalotina (30 µg)	0	X		
Cefepime (30 µg)	34			X
Cefoxitina (30 µg)	0	X		
Ceftazidima (30 µg)	30			X
Cefuroxima (30 µg)	10	X		
Ciproflaxina (05 µg)	40			X
Gentamicina (10 µg)	25			X
Meropenem (10 µg)	35			X
Sulfametoxazol-trimetropim (25 µg)	0	X		

Fonte: Os autores (2018).

Tabela 2 - Efeito da temperatura em unidades formadoras de colônias (UFC/g) durante cocção de frango experimentalmente inoculado com *Pseudomonas aeruginosa*

Temperatura	UFC
35°C	2,63E+04
50°C	1,60E+05
60°C	2,60E+03
75°C	2,30E+03
90°C	0,00E+00

Fonte: Os autores (2018).