

IDENTIFICAÇÃO DE GRAM-NEGATIVA EM GALÕES DE ÁGUA MINERAL POR MÉTODO RUGAI.

Leticia Antunes Troia Proença – Universidade Eduvale de Avaré -

leticiaantunes2019@gmail.com Agnes Cristyni Bastos Pepe -

acbastospepe@gmail.com

Angela Maria dos Santos - angela_asb@yahoo.com.br

Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros - Universidade Eduvale

de Avaré - leomedeiros07@hotmail.com

Lígia Carolina Quessada Corazza - Universidade Eduvale

de Avaré - Ligia.corazza@ead.eduvaleavare.com.br

RESUMO:

Existe uma vasta diversidade de bactérias gram-negativas, encontradas na natureza, muito conhecidas como “bactérias oportunistas”, as quais são identificadas por meio da coloração de Gram como bacilos. Uma gama desses microrganismos pertencem ao grupo das enterobactérias denominadas dessa maneira por ficarem na parte interna do corpo, muitas vezes ligada ao intestino do ser humano e vários outros animais, como parte integrante da microbiota normal. A contaminação por microrganismos gram-negativos é uma grande preocupação não apenas dentro dos hospitais, mas também em indústrias alimentícias, que podem colocar em risco a saúde e bem estar da população de modo geral. O estudo teve como objetivo a identificação dos microrganismos presentes em uma placa de ágar PCA, contendo amostras derivadas de galões de água mineral com suspeita de contaminação, por meio do método Rugai modificado em conjunto ao método de coloração de gram. A análise microbiológica do material foi realizada no laboratório de Biologia da Universidade Eduvale de Avaré-SP. A metodologia utilizada confirmou a presença de bacilos gram negativos, sugerindo então se tratar da bactéria *Alcaligenes Faecalis*. Os resultados obtidos ressaltam a importância de implementar medidas preventivas eficazes para que seja evitada a propagação dessas bactérias em galões de água mineral.

Palavras-chave: Água mineral. Enterobactérias. Gênero *Alcaligenes*.

INTRODUÇÃO:

A epidemiologia das bactérias da família *Enterobacteriaceae* tem sido amplamente investigada pois os bacilos Gram negativos não fermentadores (BGNNF) são comumente chamados de “bactérias oportunistas”, afetam seus hospedeiros quando imunocomprometidos (ROSS,2011). Pacientes internados em instituições de saúde estão

expostos a uma variedade de microorganismos patogênicos, contudo infecções por essa classe de bactérias também podem ocorrer por ingestão de alimentos contaminados, podendo ser facilmente encontradas em solos e na água (GASPAR,2012). As enterobactérias geralmente apresentam resistência elevada a vários antibióticos e são capazes de causar infecções graves, caracterizadas por disseminação rápida e progressiva ocasionando importante problema de saúde pública mundial (ANVISA, 2004). Principalmente nas infecções do trato respiratório, devido à sua ampla distribuição ambiental e sua capacidade de se manter viável nestes ambientes, particularmente na água e em seus sistemas de distribuição (SILVA,2016).

O trabalho teve como objetivo fazer a identificação das colônias de bactérias presentes na placa em ágar PCA, contendo amostras derivadas de galões de água mineral com suspeita de contaminação pelo método Rugai modificado em conjunto com a coloração de Gram.

MATERIAL E MÉTODOS:

Para que o estudo fosse possível, três galões de água mineral com possível contaminação foram enviados ao laboratório de biologia da Universidade Eduvale de Avaré. Este material foi plaqueado em placas Petri contendo ágar Macconkey e em ágar Nutriente.

Escala de McFarland e ressuspensão das colônias :

A escala de McFarland foi realizada com a metade das colônias obtidas em placa contendo ágar PCA (Ágar padrão para contagem), para a padronização das sementeiras nas placas. A escala foi aferida com um tubo teste, o qual já passou por todo o processo de padronização como confere as etapas do preparo da escala de turbidez. Foi adicionado a um tubo de vidro estéril 5 ml de solução tampão (Salina), com a metade das colônias da placa, a salina foi adicionada aos poucos até chegar o mais próximo possível da escala modelo. (figura 1 e 2), estas foram mantidas em refrigeração por aproximadamente 8 dias.

Foi realizada a ressuspensão da metade das colônias da placa em um tubo cônico graduado, contendo água Peptonada de 9 ml, em frente ao bico de Meker, o pré enriquecimento mantido em estufa de 37 graus por em média 24 horas, pode recuperar bactérias injuriadas e estressadas, devido ao período de refrigeração aos quais foram submetidas.

Figura 1- Processo de realização da escala Mcfarland para melhor diluição da amostra obtida através das colônias em

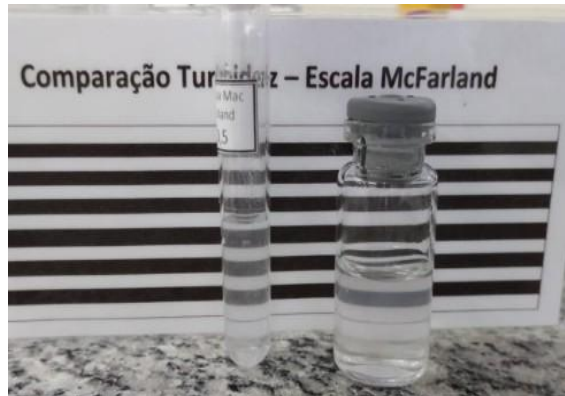
Figura 2- Comparação de uma escala de mcfarland previamente feita com a escala

placa de ágar PCA.



Fonte: De autoria própria, 2023.

obtida através da diluição das colônias.

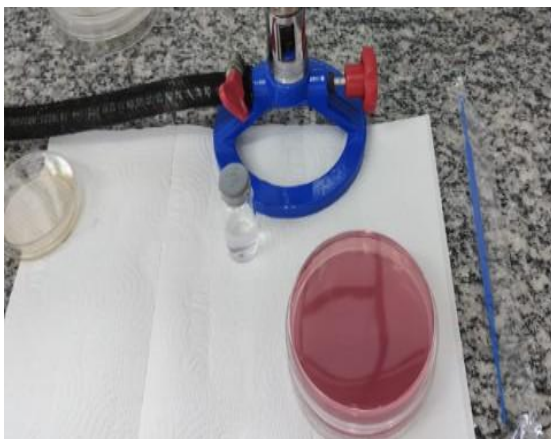


Fonte: De autoria própria, 2023.

Semeadura nas placas :

Após o processo de ressuspensão e padronização foi utilizado a amostra já dentro da escala, para efetuar a semeadura com alças descartáveis nas placas com ágar MacConkey (MCC) e ágar Nutriente (NUT), Duas placas de MCC e duas de NUT foram repicadas com o método de estriagem, incubadas no período de 24 horas em estufa de 37 graus. (Figura 3 e 4)

Figura 3 - Semeadura da escala de McFarland em placas de ágar MCC com a técnica utilizada de estrias para isolamento de colônias.



Fonte: De autoria própria, 2023.

Figura 4 - Semeadura da escala de McFarland em ágar NUT com a técnica utilizada para contagem de colônias.



Fonte: De autoria própria, 2023.

Prova bioquímica (Rugai):

Após o período de incubação das placas de MCC, foi escolhido apenas uma colônia de cada placa, que estivesse mais isolada possível, para fazer a realização da prova bioquímica. Em frente ao bico de Meker 3 colônias foram passadas para o Rugai, levando a

colônia escolhida até romper o vascar, chegando a fase inferior e estriado no ápice, com o auxílio de alças descartáveis, e incubado por 24 horas a 37 graus. (figura 5)

Figura 5- Semeadura de 3 colônias isoladas em placas com ágar MCC para o Rugai modificado.



Fonte: De autoria própria, 2023.

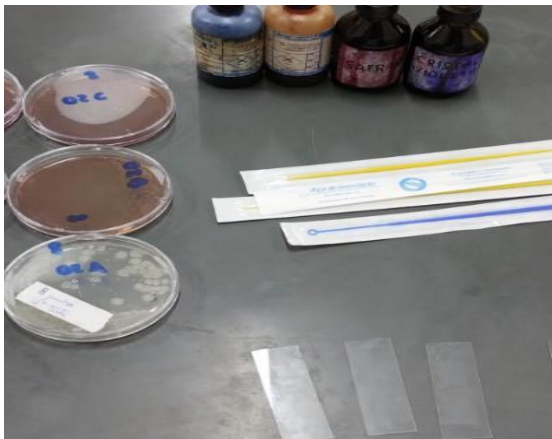
Coloração de Gram :

Para realização da coloração de gram, foi necessário 3 lâmina de vidro com uma gota de água destilada em cada uma, com o auxílio de alças descartáveis, foi feito um esfregaço com movimentos circulares das colônias escolhidas a partir de 3 colônias diferentes da placa de MCC no líquido e flambado gentilmente no bico de Meker até a água evaporar e formar uma “cera” na lâmina. Desta forma foi possível fazer um teste em triplicata.

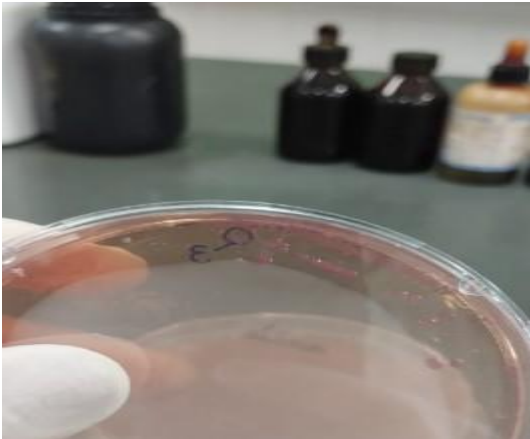
Após o preparo foi efetuada a coloração das lâminas, com a realização do processo de coloração levando a 1 minuto com cristal violeta e lavagem com água destilada, 1 minuto no lugol, lavagem com água, álcool e água novamente, safranina por 30 segundos e última lavagem com água destilada. Foi observada em microscópio em lâmina de 100X, com óleo de imersão. (figura 6 e 7)

Figura 6- Preparo das lâminas para identificação de gram, utilizando colônias isoladas em MCC para o preparo em triplicata.

Figura 7- Uma das colônias isoladas em ágar MCC escolhida para fazer o esfregaço na lâmina, utilizado para a coloração de gram.



Fonte: De autoria própria, 2023.

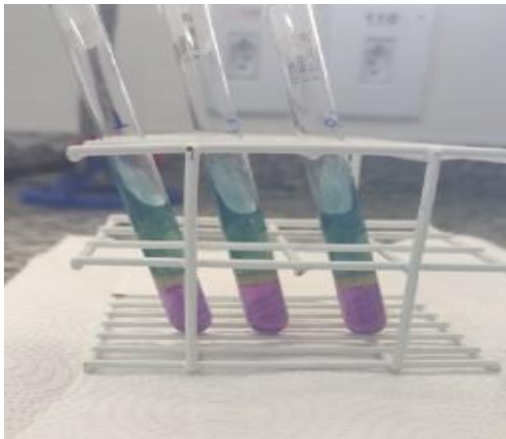


Fonte: De autoria própria, 2023.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Após o tempo de incubação do Rugai, foi efetuada a comparação com a tabela modelo, demonstrando nítido resultado para *Alcaligenes* sp. (Figura 8 e Tabela 1). Para a comprovação desse dado foi feita a coloração de gram em triplicata, na qual todas as lâminas analisadas apresentam presença de bacilos, ou seja, gram negativa, corroborando com os resultados obtidos pelo Rugai. (Figura 9)

Figura 8 - Resultado do teste em triplicata semeado no Rugai modificado, apresentando presença da bactéria de gênero *Alcaligenes*.



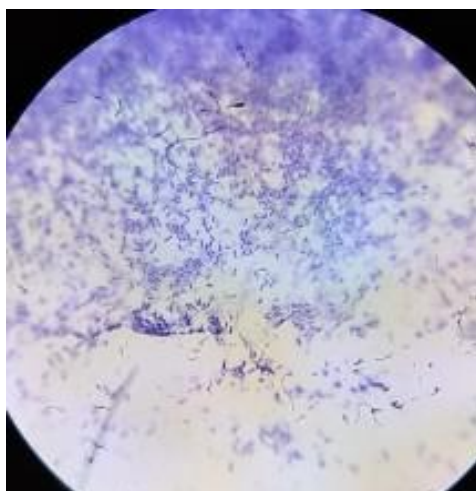
Fonte: De autoria própria, 2023.

Tabela 1- Tabela para comparação dos resultados obtidos com a semeadura no Rugai modificado.

Teste	Resultados
Produção de pigmento	-
Coloração de gram	Bastonete gram-negativo
Motilidade	+
Hemólise	-
O-F + Glicose	-
Produção de oxidase	+
Redução de nitratos	+
Liquefação de gelatina	-
TSI	Alcalino/sem alterações
Uréia de stuart	-
Utilização de carboidratos	
Glicose	-
Sacarose	-
Manitol	-
Maltose	-
Sorbitol	-
Xilose	-
Crescimento em:	
McConkey	+
Salmonella-Shigella	+
Citrato de Simmons	-
Requerimento de oxigênio	Aeróbica estrita

Fonte: SONCINI, 1884.

Figura 9- Coloração de gram evidenciando bacilos, oriundos das amostras isoladas em ágar MCC.



Fonte: De autoria própria, 2023.

A análise comparativa dos resultados obtidos na tabela 1, fica evidente a falta de produção de pigmento conforme mostra a imagem 8. Os dois métodos de identificação utilizados, foram especialmente escolhidos para dar maior embasamento teórico nos resultados, lavando assim a um resultado confiável, obtendo duas provas, coloração de gram e o rugai com 9 provas bioquímicas em apenas um tubo conforme apresentado em ROCHA, 2018, mas com os resultados obtidos neste trabalho não foi possível chegar a nível de espécie, pois o Gênero *Alcaligenes* apresenta 4 espécies diferentes. Contudo, quando relacionado os resultados da presente pesquisa ao local de coleta das amostras contaminadas, com a literatura disponível (SILVA, 2016) sugere-se a espécie *Alcaligenes faecalis* devido ser uma bactéria encontrada em água e solo com frequência.

Outros estudos ainda apontam a *Alcaligenes faecalis* como bastonetes gram negativos curtos, sendo considerada agente patogênico para organismos aquáticos (OLINDA, 2014) além da incidência dessa mesma bactéria em formigas que servem de vetores de infecções hospitalares trazidas do solo e/ou água (BARTOLI, 2017)

ROSS et al (2011) ressalta a resistência dessas bactérias a vários tipos de antibióticos, o que corrobora para a proliferação de *Alcaligenes faecalis* nos galões de água minerais após a etapa de desinfecção das embalagens de polipropileno no processo de envase utilizando detergente alcalino. Para a confirmação da presença de bacilos *Alcaligenes faecalis* e compreensão dos mecanismos etiopatológicos em galões de água mineral, mais estudos devem ser implementados ressaltando a importância de medidas preventivas eficazes para evitar a proliferação dessas bactérias.

CONCLUSÃO:

A presença de bactérias gram negativas nas amostras coletadas dos galões de água mineral foram comprovadas por meio do método Rugai. Contudo, novos estudos devem ser realizados para que seja comprovado a existência dessa bactéria patogênica oportunista da família Enterobacteriaceae em nível de espécie, *Alcaligenes faecalis*, a qual foi sugerida neste trabalho.

REFERÊNCIAS:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, (ANVISA). Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, 2004. Acesso em: 04/07/2023. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/microbiologia/mod_6_2004.pdf>

BORTOLI, Jacqueline. Bactérias patogênicas de interesse para a saúde pública associadas às formigas em um ambiente hospitalar. Anais de Medicina, 2017, p. 30-31. Acesso em: 04/07/2023. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/anaisdemedicina/article/view/15887>

GASPAR R., Maria Dagmar, Busato, Cesar Roberto y Severo Emanuel . Prevalência de infecções hospitalares em um hospital geral de alta complexidade no município de Ponta Grossa. Acta Scientiarum. Health Sciences. 2012;34(1):23-29. Acesso em: 04/07/2023. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307226630004>

OLINDA, Roberio Gomes et al. Isolamento de Alcaligenes faecalis em peixe Betta splendens Regan, 1910 no Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, v. 81, p. 360-362, 2014. Acesso em: 04/07/2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/qs9ztNg54Vq8Vs3hzP8Yvwg/?lang=pt&format=pdf>

ROCHA, Carlos Henrique Lopes; MUNIZ, Geovane Santos; ROCHA, Flaviane Maria Galvão. Identificação de bactérias presentes em biofilmes de superfícies metálicas. Revista de Investigação Biomédica, v. 10, n. 2, p. 172-180, 2018. Acesso em 05/07/2023. Disponível em: <file:///C:/Users/clau/Downloads/284-711-1-PB.pdf>

ROSS M. ; SCHMITT B. A. M ; TOMAZZI R. C. ; CECCHIN R. S. ; MOURA F. ; ZANELLA J. N. C. PRINCIPAIS BACTÉRIAS NÃO FERMENTADORAS ENVOLVIDAS NAS INFECÇÕES HOSPITALARES; 2011. Acesso em: 04/07/2023. Disponível em: <https://home.unicruz.edu.br/seminario/anais/anais-2011/saude/PRINCIPAIS%20BACT%20RIAS%20N%20FERMENTADORAS%20ENVOLVIDAS%20NAS%20INFEC%20HOSPITALARES.pdf>

SILVA, A. O. et al. Pesquisa de bacilos Gram negativos não fermentadores no interior do corpo de torneiras em hospital privado. RBAC, v. 48, n. 1, p. 744-77, 2016. Acesso em: 05/07/2023. Disponível em: https://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/05/ARTIGO-13_VOL-48_1_2016-ref-185-1.pdf

SONCINI, Ricardo A.; PIFFER, Itamar A.; KRACKER, Cláudio. Rinotraqueíte dos perus causada por uma bactéria do grupo Bordetella bronchiseptica-Alcaligenes sp., no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 19, n. 12, p. 1519-1521, 1984. Acesso em: 05/07/2023. Disponível em: <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/16253>