



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

### ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* NA ÁGUA UTILIZADA PARA DESSEDENTAÇÃO DO GADO BOVINO EM UMA FAZENDA NO ESTADO DA BAHIA

**Bruna de Jesus Mamona<sup>1</sup>; Claudio Roberto Nóbrega Amorim<sup>2</sup>**

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[bjmamona@gmail.com](mailto:bjmamona@gmail.com)

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[amorim@uefs.com](mailto:amorim@uefs.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Escherichia coli*; diarreia; bovino.

#### INTRODUÇÃO

A água é uma substância de vital importância para a sobrevivência da maior parte dos organismos vivos. Essa água, quando destinada ao consumo humano e animal deve estar livre de substâncias ou organismos patogênicos. Sendo utilizada na dessedentação animal, pode ser veículo de agentes biológicos causadores de doenças animais, como: paratifo dos bezerros, as pestes suína e aviária, anemia infecciosa equina, cinomose e colibacilose (SOUZA *et al.* 1983). A colibacilose, em particular, é uma patologia que acomete animais neonatos, causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica. Ao se proliferar pelo intestino do animal, a *E. coli* produz enterotoxinas que causam um aumento na secreção de líquido da circulação sistêmica para a luz intestinal, causando vários graus de diarreia e desidratação (RECK, 2009).

A fim de minimizar ou extinguir riscos à saúde humana e animal, a resolução normativa nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005) estabelece parâmetros de qualidade a serem atendidos. Dessa forma, alguns microrganismos são utilizados como indicadores de contaminação, seja na análise microbiológica de alimentos como também da água. A utilização dos coliformes totais e termotolerantes como indicadores de contaminação, nos revela a ocorrência de condições sanitárias impróprias, contaminação fecal ou presença de patógenos. (COSTA *et al.* 2013; SOUZA *et al.* 1983). Os Coliformes são membros da família Enterobacteriaceae que inclui o gênero *Escherichia* e outros. A identificação de contaminação fecal é feita através da identificação da *Escherichia coli*, principal representante do grupo dos coliformes termotolerantes, que tem habitat exclusivo no trato intestinal de animais de sangue quente (SOUZA *et al.* 1983).

A capacidade da *E. coli* em instalar-se e colonizar o hospedeiro causando patologias dá-se devido aos fatores de virulência por ela codificados, podendo ser citados, como exemplo, as fimbrias e as toxinas. (AZOLA, 2016). Nataro & Kaper (1998), classificaram a *E. coli* levando em consideração o conjunto gênico que caracteriza sua patogenicidade, em: ETEC (enterotoxigênica), EPEC (enteropatogênica) EAEC (enteroagregativa), DAEC (difusamente aderente), EHEC (enterohemorrágica), STEC (shigatoxigênica) e EIEC (enteroinvasiva).

A *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), tem como característica principal a produção de duas enterotoxinas: a termolábil (LT) e a termoestável (ST). A ação de ambas as toxinas culmina na diminuição da absorção de sódio e na abertura de canais iônicos que

liberam cloro ocasionando o acúmulo de líquido no lúmen intestinal; diferindo apenas nos mensageiros secundários da cascata, sendo o AMPc para a toxina termolábil e o GMPc para a toxina termoestável (ALMEIDA, 2013; AZOLA, 2016). Outro fator de virulência importante na colonização e aderência da bactéria ao tecido hospedeiro, são as fímbrias. São moléculas proteicas que estão presentes na superfície bacteriana com a função de reconhecer os receptores da superfície da célula hospedeira. Existem diversos tipos de adesinas mas, embora elas não apresentem muita diferença morfológica, possuem hemaglutinantes diferentes (AZOLA, 2016; ALMEIDA, 2013).

As doenças que podem ser transmitidas pela ingestão da água contaminada, principalmente em bovinos, suínos e aves, podem resultar em problemas à economia levando a prejuízos financeiros; e à saúde pública, visto que em alguns casos essas doenças podem ser transmitidas a seres humanos. Dessa forma, o estudo da qualidade água utilizada na dessedentação do gado, se faz necessário a fim de evitar uma possível contaminação. Portanto, o presente trabalho objetivou analisar microbiologicamente a água destinada à dessedentação do gado bovino em uma fazenda do município de São Gonçalo, a fim de identificar possível contaminação na mesma. Adicionado a isto, identificar possível contaminação fecal na água e se esta, está de acordo com os padrões estabelecido pelo CONAMA para a dessedentação animal. Contribuindo, dessa forma, com conhecimentos sobre contaminação e propagação de doenças por meio da água. Bem como, com seu desenvolvimento servir de aprendizado de técnicas que visam isolar e identificar *E. coli* e seus fatores de virulência.

## **MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA**

Foram realizadas três coletas, com intervalo aproximado de 60 dias entre os meses de agosto a dezembro de 2018. Sendo coletado cerca de 100mL de água de sete pontos, entre bebedouros de cimento e lagoas, que o gado utiliza para a dessedentação, utilizando-se frascos com 0,1 mL de tiosulfato de sódio a 10% previamente esterilizado. Após cada coleta, as amostras foram devidamente etiquetadas, acondicionadas e transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia Aplicada à Saúde, na Universidade Estadual de Feira de Santana, para a análise microbiológica. A partir das amostras obtidas dos bebedouros foi realizada técnica do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes segundo descrito pelo Manual Prático de análise de água, disponibilizado pela FUNASA em 2009.

As amostras positivas para coliformes termotolerantes no NMP seguiram para isolamento e identificação de *Escherichia coli*. Estas foram semeadas por esgotamento no Agar Eosina-Azul de Metileno e incubadas a 37°C durante 24h. Após o período de incubação, cerca de cinco colônias suspeitas de *E. coli* foram inoculadas em meio BHI a 37°C durante 24 horas. As amostras crescidas em BHI seguiram para os demais testes de identificação. Foram eles: fermentação de lactose, descarboxilação de lisina, produção de urease, testes Vermelho Metila e Voges-Proskauer. Além desses, foram feitos testes para verificar a produção de indol e a utilização de citrato como fonte de carbono. (Koneman, 2001).

Do total de colônias isoladas e identificadas de *E. coli* foram selecionadas 60, de forma aleatória e de modo que houvesse três amostras de cada ponto de cada coleta, para a detecção de fímbrias manose resistentes e produção de hemólise. Para a detecção de fímbrias manose resistentes foi realizado o teste de microhemaglutinação manose resistente (MHMR), sendo coletados eritrócitos de humano, boi, cavalo e carneiro utilizando solução anticoagulante e posteriormente preservados à 4°C. As hemácias foram lavadas por quatro vezes com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, contendo 1% de manose (PBS-M) até a formação de sobrenadante transparente e utilizadas na

concentração de 1%. Para a realização do teste MHMR, foram utilizadas microplacas com 96 poços e base em U. As amostras de *E. coli* foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Minca (Guiné et al. 1977), modificado com a substituição de casaminoácido por peptona, a 37°C por 24 horas. A suspensão bacteriana foi então diluída em PBS-M na razão de 1:2 até 1:16. Posteriormente, foram adicionados 50µL de suspensão de eritrócitos a 1%. As placas foram incubadas por 2 horas, à 4°C. Após este intervalo de tempo, se procedeu a leitura.

Para o teste de produção de hemólise a bactéria foi cultivada em placas contendo meio ágar-sangue, a uma concentração de 5% de sangue de carneiro e postas em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas para crescimento (Ribeiro *et al*, 2006).

## RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A partir da Técnica do Número Mais Provável foi obtido que todos os pontos amostrados, em todas as três coletas, estão de acordo com a recomendação do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) em sua resolução N°357/2015. Tendo em vista que os maiores valores para coliformes termotolerantes observados em cada coleta foram: 80 UFC/100mL no ponto 7 durante a primeira coleta, 240 UFC/100mL nos pontos 2, 4 e 7 na segunda coleta e 170 UFC/100mL no ponto 4 a partir da terceira coleta. Na segunda coleta, somente seis pontos foram amostrados devido à secagem da água de um dos pontos. Na terceira, todos os sete pontos foram amostrados novamente.

Das amostras positivas para coliformes termotolerantes da etapa confirmativa do NMP foram isoladas e identificadas como *Escherichia coli* um total de 436 colônias.

Das 60 colônias analisadas no teste MHMR, apenas 13 apresentaram resultado positivo para pelo menos um tipo de eritrócito, sendo oito amostras positivas para sangue humano, oito para sangue bovino, uma para sangue de carneiro e nenhuma para sangue cavalo. Somente 5% das amostras de *E. coli* hemaglutinaram com mais de um tipo de hemácia. O título dos resultados positivos para as amostras variou de 1/2 a 1/16, com somente uma amostra hemaglutinando até a titulação máxima. Em contrapartida, 78,3% das amostras apresentaram resultados negativos com todos tipos de eritrócitos.

Analisando os resultados constata-se que praticamente todas amostras que apresentaram resultados positivos hemaglutinaram com hemácias de humano e bovino. De acordo com Duguid *et al* (1972) o teste MHMR com hemácias de ovino podem apresentar resultados falso-positivos, no entanto, apenas uma amostra e justamente a que apresentou maior titulação de resultado positivo apresentou hemaglutinação com este tipo de hemácia. Pelo fato de testes com sangue de ovino terem maior probabilidade de apresentarem resultados falso-positivos, é mais seguro supor que as amostras que possivelmente apresentam fímbrias manose resistente (MR) são aquelas que aglutinaram com mais de um eritrócito ou que hemaglutinaram somente com um eritrócito que não seja de ovino. Portanto, as amostras 1(3)1, 2(4)1, 8(2)1, 9(1)1, 24(2)1, 36(2)1, 37(3)1, 19(4)2, 22(1)2, 29(1)2, 7(1)3, 24(4)3 e 25(3)3 possivelmente apresentam algum tipo de fímbria MR.

Os tipos de fímbrias MR frequentemente encontradas em linhagens de *E. coli* enterotoxigênica são F5, F41 e F17. A fímbria F41, mesmo em presença de manose, hemaglutina com hemácias de humano, cobaio, cavalo e carneiro, enquanto que a F5 nas mesmas condições se liga a hemácias de cavalo e carneiro (Gaastra & De Graaf, 1982). Em vista disso, há grande possibilidade das amostras positivas em sangue de humano serem da fímbria F41.

Por fim, dentre as 60 amostras testadas, somente uma apresentou halo de hemólise. Sendo, portanto, 98,3% das amostras não hemolíticas. A produção de hemolisina pela bactéria é um importante fator, pois essa toxina é capaz de lisar as hemácias fornecendo ferro para captura (Almeida, 2013).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que os pontos de água para a dessedentação do gado bovino estão viáveis para o fim a qual são destinados no período que deu o trabalho. Há probabilidade de haver presença de ETEC na água, devido a possível presença de fímbria MR característica dessa estirpe. A detecção de uma colônia que apresenta a produção de hemolisina é importante, pois pode conferir um fator de risco a estes animais a partir da contaminação por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). No entanto, os resultados positivos para as fímbrias MR são poucos e requerem maiores teste para confirmação, como a realização de técnica de reação em cadeia da polimerase para detectar os genes que codificam tais estruturas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.M. de S; 2013. Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia
- AZOLA, J.S.M.; 2016. Genes de virulência e perfil de susceptibilidade a extratos vegetais de isolados de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC), Shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em bezerros. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.
- BRASIL.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente [CONAMA]. 2005. Resolução CONAMA nº 357, de 17 março de 2005. Disponível na World Wide Web em: <[http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO\\_CONAMA\\_n\\_357.pdf](http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf)> [04 jun. 2019].
- COSTA *et al.* 2013. Análise físico-química e microbiológica da água de tanques utilizados na dessedentação de bovinos. Revista de Ciências Exatas e da Terra UNIGRAN, v2, n.2, p43-55.
- DUGUID, J. P. et al. 1978. The fimbrial and non- fimbrialhaemagglutinins of *Escherichia coli*. Journal of Medical Microbiology. 12: 213-228.
- FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. 2009. Manual prático de análise de água. 3ª ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde.
- GAASTRA, W. & DE GRAAF, F. K. 1982. Host - specific fimbrialadhesins of noninvasive *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. 46 (2): 129-161.
- GUINÉE, P. A. M et al. 1977. Improved Mincamédium for detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 15: 676-678.
- KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.1465.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; 1998. Diarrhegenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews; 11(1): 142-201.
- RECK, M.V.M., 2009. Diarreia Neonatal Bovina. Porto Alegre, UFRGS. Disponível em:<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/22919/000735566.pdf?sequence=1>>. Data de acesso: 24 jul 2019.
- RIBEIRO, M.G et al.; 2006. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isolados de mastite bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58(5): 724-731.
- SOUSA *et al.* 1983. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. Rev. Sau. Publica. 17:112- 22. São Paulo.
- STELLA, A.E.; 2009. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. São Paulo.