

¹ Instituto Federal de Minas Gerais - *campus Bambuí*

IDENTIFICAÇÃO DA *ESCHERICHIA COLI* EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE MANANCIAIS DA SERRA DA CANASTRA-MG

As técnicas de estria de esgotamento e coloração de são práticas essenciais na microbiologia, utilizadas para identificar e isolar microrganismos com precisão. Amplamente empregadas em laboratórios para diagnóstico, pesquisa e controle de qualidade em diversas áreas. O presente estudo teve como finalidade geral identificar morfologicamente e fenotipicamente linhagens presuntivas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água utilizada nas queijarias produtoras do Queijo Minas Artesanal Canastra. A finalidade deste trabalho foi a de caracterizar as cepas dessa bactéria isoladas originalmente por meio de plaqueamento em ágar Chromocult®. Foram reativados 318 isolados presuntivos de *Escherichia coli* mantidos na coleção taxonômica do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG- campus Bambuí, isolados a partir de amostras de água coletadas na estação seca entre julho e agosto de 2022. Os isolados presuntivos sofrem a partir de uma reativação de forma parcial, tais amostras criopreservadas foram cultivadas em Ágar MacConkey. Neste crescimento foi evidenciado crescimento bacteriano de coloração rosa em 177 isolados confirmados como *E. coli*, crescimento de 48 isolados de coloração branca considerados como isolados que não são *E. coli* e os 93 isolados restantes não apresentaram capacidade de crescimento no Ágar MacConkey

Provavelmente, por se tratarem de bactérias Gram-Positivas. Para isolados com crescimento de colônias de coloração branca foi realizada uma etapa adicional através de coloração de Gram. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para melhor compreensão acerca da identificação da espécie estudada, sobretudo, no que tange dados fornecidos a partir de testes morfológicos e fenotípicos cruciais em etapas posteriores ao plaqueamento utilizando ágar Chromocult®.

Palavras-chave: Estria de Esgotamento. *Escherichia coli*. MacConkey. Coloração de Gram.

INTRODUÇÃO

A região da Serra da Canastra é conhecida por ser o espaço de produção do Queijo Minas Artesanal Canastra(QMAC). As propriedades rurais produtoras deste tipo de queijo, utilizam água das nascentes que abastecem ou atravessam essas propriedades, estando diretamente relacionada às etapas de sua produção, interferindo na sua qualidade final, bem como na qualidade microbiológica do queijo que tem impacto direto sobre a saúde da população sumidora (FERREIRA, 2019).

Muitos microrganismos encontrados na água que abastecem as propriedades acabam causando infecções gastrointestinais em humanos. Dentre as bactérias associadas a contaminação da água utilizada na linha de produção do Queijo Canastra, *Escherichia coli*

é uma enterobactéria de grande relevância por ser uma das principais causas de mastite bovina e ser considerada patogênica ao ser humano (GUERRA et al., 2011; DOS SANTOS, 2010). Algumas cepas de *E. coli*, ao serem ingeridas com alimentos ou na própria água, se desenvolvem no intestino produzindo toxinas que favorecem uma hipersecreção no trato gastrointestinal, podendo causar diarreia, com duração de um a três dias (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001). Muitos quadros de contaminação alimentar, intoxicação e diarreia são atribuídos a contaminação de alimentos com bactérias coliformes, especialmente *E. coli*. Neste sentido, o meio adicional empregado foi o ágar Ágar MacConkey, o mesmo dispõe de excelente eficácia para identificar bactérias negativas, portanto o mais adequado para isolar *E. coli*.

O presente trabalho tem, portanto o objetivo de confirmar através de isolamento por estria de esgotamento e por teste fenotípico de coloração de gram, isolados presuntivos de *E. coli* isoladas de mananciais que abastecem queijarias representativas da Serra da Canastra. Deste modo, acreditamos obter um grau maior de purificação das amostras utilizadas nos experimentos, bem como maior confiabilidade na identificação como isolados de *E. coli*. Os dados obtidos a partir desse estudo contribuirão para melhor compreensão acerca da identificação dessa bactéria, principalmente acerca da sua caracterização e refinaram nosso protocolo de isolamento empregando etapas iniciais de plaqueamento em meio ágar Chromocult®.

METODOLOGIA OU MATERIAL E MÉTODO

Para a realização deste projeto 318 linhagens presuntivas de *E. coli* isoladas empregando plaqueamento em ágar Chromocult® foram acessadas a partir de amostras criopreservadas em glicerol 20% v/v pertencentes à coleção taxonômica depositada no Laboratório de Biologia Molecular do IFMG-campus Bambuí. Essas linhagens foram isoladas a partir de amostras de água obtidas em 12 pontos amostrais de 12 mananciais localizados na cabeceira do Rio São Francisco que abastecem queijarias da Serra da Canastra-MG.

Com o objetivo de confirmar a identificação destes isolados presuntivos

Como linhagens de *E. coli* foi empregado seu plaqueamento em Ágar MacConkey. Portanto, foi realizada a reativação destas 318 linhagens isoladas em amostras de água coletadas na estação seca (julho e agosto de 2022), em 5 ml de caldo *BHI* (*Brain Heart Infusion*) usando inóculo de 1% v/v a partir de amostras criopreservadas em glicerol 20%

v/v. As bactérias que cresceram na reativação em caldo BHI foram semeadas em meio Ágar MacConkey, estriadas pela técnica de semeadura de estria por esgotamento. Já as bactérias que apresentaram crescimento com coloração branca não eram consideradas como confirmadas como *E. coli*. Portanto, para garantir a identificação precisa destas linhagens, estes isolados foram submetidos a um teste adicional de coloração de gram e confirmação de sua morfologia por visualização em microscopia de luz.

Após coloração de esfregaços de colônias isoladas nas estrias de esgotamento pela técnica de gram os isolados que apresentaram morfologia de bastonetes gram-negativos foram selecionados como linhagens de *E. coli*, sendo sua a pureza avaliada e confirmada microscopicamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da reativação dos 318 isolados presuntivos de *E. coli* foi observado crescimento de colônias rosas nas estrias de 177 deles em ágar MacConkey, 48 deles apresentaram crescimento de colônias de coloração branca e os outros 93 não apresentaram crescimento quando cultivados em ágar MacConkey (FIGURA 1). Este meio de cultura é frequentemente escolhido para isolar bactérias como *E. coli*, por sua seletividade, já que o mesmo contém lactose e indicadores de pH que permitem distinguir entre bactérias que podem fermentar lactose e aquelas que não podem.

FIGURA 1: Estria de esgotamento realizada em ágar MacConkey em de placa de petri. A imagem mostra isolado confirmado de *Escherichia coli* que teve crescimento de colônias rosas neste meio seletivo. Essa confirmação será comprovada na figura 2, a qual estará com lâminas de coloração de Gram.



FIGURA 2: Lâminas coradas pela técnica de coloração de gram.

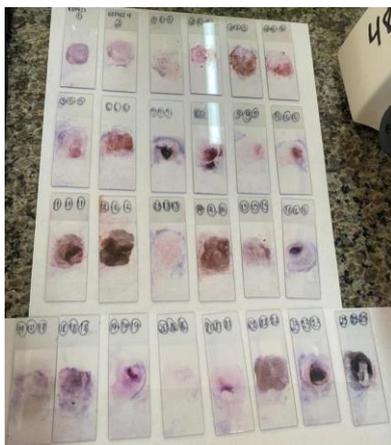
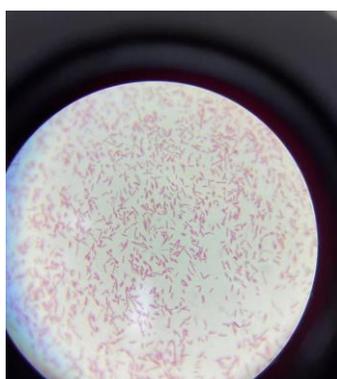


FIGURA 4: Visualização de *Escherichia coli* em microscopia óptica após coloração de esfregaço bacteriano por meio da técnica de coloração de gram e visualização em microscópio de luz usando objetiva de 100X; tal bactéria se apresenta com morfologia de bastonete gram- negativo.



Para os 48 isolados que apresentaram crescimento em ágar MacConkey com colônias brancas foi realizada a etapa adicional de coloração de um esfregaço pela técnica de gram, seguida de sua visualização em microscopia de luz usando a objetiva de 100x. Por essa técnica foi observado que estes isolados não eram *E. coli*, mas sim bactérias gram positivas com morfologia de cocos (FIGURA 5) possivelmente do gênero *Enterococcus*. Por ser um meio extremamente seletivo o MacConkey inibe crescimento de bactérias gram positivas, portanto, não é comum esse crescimento, neste caso pode-se levar em consideração alguma forma de contaminação, erro laboratorial ou até mesmo cepas de *Enterococcus* que possuem características incomuns de resistência ao meio.

CONCLUSÃO

Após a estria de esgotamento e a coloração de Gram dos isolados purificados, ficou evidente que essas práticas desempenharam um papel fundamental no protocolo de isolamento de *E. coli* usando o meio seletivo Chromocult®. Elas garantiram que apenas as cepas verdadeiras de *E. coli* fossem identificadas, assegurando a precisão do experimento de isolamento. Além disso, nossos resultados destacam que, embora o meio seletivo MacConkey favoreça o crescimento de bactérias gram-negativas, algumas bactérias do

gênero *Enterococcus* também podem crescer nele. Esses dados foram essenciais para aprimorar o protocolo de isolamento utilizado na segunda fase das coletas durante a estação chuvosa, incluindo etapas obrigatórias de estriamento em ágar MacConkey seguido pela coloração de Gram das colônias.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a PRPPG-IFMG pelo fomento do projeto "Prospecção de genes de resistência e virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas a partir da água utilizada na produção do Queijo Canastra e estabelecimento de um novo processo de estimação da qualidade da água." através do edital 087/19 de Pesquisa Aplicada que custeou parte dos materiais de consumo aqui consumidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOS SANTOS, J. L. Uso e manejo da cloração de água na atividade pecuária. In: Simpósio de Produção Animal e Recursos hídricos. Anais...Concórdia, SC, 2010.

FERREIRA, Fernanda Silva. Qualidade da água e do Queijo Minas Artesanal de propriedades cadastradas da microrregião Canastra. **Mestrado Profissional em Sustentabilidade em Tecnologia Ambiental**, p. 73-73, 2019.

GUERRA, M. G.; GALVÃO JÚNIOR, J. G. B.; RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; et al.

Disponibilidade e qualidade da água na produção de leite. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, n. 3, p. 230-235, 2011.

LOGUERCIO, A. P., ALEIXO, J. A. G. Microbiologia do queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, 2001.

SILVA, Ricardo Mendes. Considerações sobre os aspectos macroscópicos do fígado de frango contaminado por *Escherichia coli* e *Salmonella*. 2016.

MÓDULO, V. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica.

RIBEIRO, Jéssica Caroline Bigaski et al. Qualidade físico-química e microbiológica do queijo parmesão ralado comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 387, p. 21-29, 20