

Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* e enumeração de coliformes fecais em carne de rã (*Rana catesbeiana*) no 1^o, 7^o e 15^o dias de estocagem a 0°C ± 1°C

Survey for *Pseudomonas aeruginosa* and enumeration of fecal coliforms in frog meat (*Rana catesbeiana*) on the 1st, 7th and 15th days of storage (0°C ± 1°C)

Patricia Maria Rocha Gonçalves,* Robson Maia Franco,* Valéria Moura Oliveira*

Resumo

O presente estudo reporta observações sobre a qualidade microbiológica da carne de rã. Objetivou-se avaliar nas amostras no 1^o, 7^o e 15^o dias de estocagem a 0°C ± 1°C, a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, comparar a eficiência dos métodos de enriquecimento seletivo e plaqueamento direto, as temperaturas de incubação e verificar a presença de coliformes fecais neste tipo de alimento. O percentual das amostras positivas para *P. aeruginosa* no 1^o, 7^o e 15^o dias foi de 40%, 43,33% e 30%, respectivamente. Para coliformes fecais, também nos respectivos dias, foi de 46,67%, 33,33% e 43,33%. Os dados observados indicam que o enriquecimento seletivo foi o método de melhor eficiência e a incubação a 37°C apresentou maior facilidade para o crescimento de *Pseudomonas*.

Palavras-chave: rã; microbiologia; métodos.

Introdução

O consumo de carne de rã aumentou nos últimos anos, por ser uma carne de alto valor nutricional, ter proteínas de grande digestibilidade, baixo teor de gordura e boa palatabilidade, sendo muito utilizada na alimentação de pessoas debilitadas e que tenham o estômago mais sensível. Fabichak (1989) relata que a carne de rã é consumida há muitos anos em países asiáticos, europeus e nos Estados Unidos. No Brasil é crescente o consumo e o interesse da população pela mesma. A carne de rã fresca é largamente comercializada em nosso país. Conforme esclarece Silva (1995), o Brasil é o maior produtor mundial de rãs em cativeiro, com tecnologia única, inclusive de abate.

Alguns autores realizaram pesquisas a partir de amostras de carne de rã. Franco e Oliveira (1986), por exemplo, analisaram amostras de carne de rã touro gigante (*R. catesbeiana*, Shaw) congelada e encontraram produtos inadequados ao consumo após o congelamento. Rodrigues et al. (1994) observaram coliformes fecais em 83% das amostras de carne de rã (*Leptodactylus* sp) congelada por eles analisadas. Desse percentual, 53% estavam impróprias para o consumo, em relação a este grupo de microrganismos. Através desses aspectos, observamos que a qualidade microbiológica dessa carne é fundamental, principalmente no que diz respeito às suas características higiênico-sanitárias.

As *Pseudomonas* são bastonetes Gram-negativos, curtos e geralmente móveis devido a presença de um flagelo polar. A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista que invade membranas mucosas não protegidas por leucócitos polimorfonucleares, como pode ser observado em indivíduos imunodeprimidos (Johnson, 1990). De acordo com este autor, *P. aeruginosa* é capaz de crescer em temperatura de refrigeração, deteriorar alimentos como o pescado, onde se torna predominante durante estocagem em refrigeração, além de ser um germe oportunista, causador de gastroenterite no homem.

Gram (1993) cita que bactérias do gênero *Pseudomonas* são importantes microrganismos deterioradores em produtos resfriados, além de terem atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Frazier e Westhoff (1993) destacam a capacidade de algumas espécies de *Pseudomonas* em crescer em baixas temperaturas, possuir atividade proteolítica e lipolítica.

Muitas espécies de *Pseudomonas* são capazes de deteriorar alimentos protéicos mantidos em baixas temperaturas (Johnson, 1990) e segundo Leitão (1977), as bactérias do gênero *Pseudomonas* tendem a predominar na microbiota do pescado durante a deterioração e os demais gêneros decrescem progressivamente, sendo que o aumento acentuado da população de *Pseudomonas* em peixes armazenados a 5°C por 14 dias também foi observado.

* Universidade Federal Fluminense. Faculdade de Veterinária. Rua Vital Brazil Filho, 64 – Vital Brazil. CEP 24230-340 – Niterói-RJ.

Espécies de *Pseudomonas* predominam em vários alimentos refrigerados e são capazes de inibir microrganismos patogênicos e causadores de deterioração em alimentos (Freedman et al., 1989), sendo a sua pesquisa essencial nos mesmos. Gram (1993) cita que as interações entre microrganismos, a competição por nutrientes do substrato e o antagonismo bacteriano são fenômenos conhecidos e que influenciarão a seleção de uma microbiota.

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1952), a rã é considerada um pescado e, seguindo a legislação de nosso país, considerou-se as amostras estudadas neste trabalho como tal.

Também objetivou-se avaliar no 1^o, 7^o e 15^o dias de estocagem a 0°C ± 1°C, a presença de *P. aeruginosa* em carne de rã (*R. catesbeiana*). Além disso, objetivou-se comparar a eficiência dos métodos de enriquecimento seletivo, de plaqueamento direto, bem como as temperaturas de incubação utilizadas no plaqueamento direto, verificar ainda a presença de coliformes fecais neste tipo de alimento, uma vez que estes germes indicam as condições higiênico-sanitárias do mesmo, fornecendo, desse modo, dados auxiliares aos órgãos de fiscalização sanitária de alimentos.

Material e métodos

Foram analisadas trinta amostras de carne de rã (*Rana catesbeiana*) mantidas sob refrigeração (0°C ± 1°C) até o momento das seguintes análises: enumeração de coliformes fecais e pesquisa de *P. aeruginosa* utilizando o enriquecimento seletivo com temperatura de incubação de 37°C e o plaqueamento direto nas temperaturas de incubação de 37°C e 42°C.

Essas amostras foram provenientes de dois abatedouros frigoríficos com fluxograma de abate semelhantes. Foram enviadas por via aérea no mesmo dia de abate, embaladas em sacos plásticos de polietileno e mantidas à temperatura de 0°C ± 1°C em recipiente isotérmico com gelo. Foram então mantidas em refrigerador doméstico, repondo-se diariamente o gelo para que permanecessem sempre na mesma temperatura.

Para a pesquisa de *P. aeruginosa*, procedeu-se à seguinte técnica (Merck, 1990; Palleroni, 1984): homogeneizou-se 25g de amostra (fragmentos musculares de diversas partes das carcaças inteiras de rã) com 225ml de solução salina peptonada a 0,1% em *waring blender* por 2 minutos, obtendo a diluição 10⁻¹. Partindo-se desta, realizou-se o plaqueamento direto em Ágar Cetrimide, cuja temperatura de incubação foi de 37°C e 42°C por 24-48h. Transferiu-se 10ml da diluição para tubos contendo Caldo Verde Malaquita, realizando-se a fase de enriquecimento seletivo. A temperatura de incubação foi de 35-37°C por 24 h. Partindo do subcultivo crescido no Caldo Verde Malaquita, semeou-se placas contendo agar Cetrimide que foram in-

cubadas conforme o plaqueamento direto. As unidades formadoras de colônias (UFC) típicas (com pigmento verde-azulado, piocianina) e isoladas crescidas foram repicadas para tubos contendo Ágar Tríplice Açúcar Ferro inclinado e estes incubados a 35°C – 37°C por 24h. Posteriormente, realizaram-se as seguintes provas bioquímicas para a caracterização da espécie: oxidase, oxidação e fermentação da glicose, manitol e inositol, gelatinase, redução do nitrato a nitrito, citrato, crescimento a 42°C, urease, lactose e provas do sulfeto, indol e mobilidade no meio SIM.

A enumeração de coliformes fecais seguiu a técnica da múltipla fermentação em tubos (Hitchins et al., 1992). No teste presuntivo utilizou-se o Caldo Lauril Sulfato, para o teste confirmativo o Caldo EC e, no teste completo, o Ágar Eosina Azul de Metileno segundo Levine. Partindo das UFC, que se apresentaram negras e com brilho verde-metálico, foram selecionadas 3 a 5. Estas foram submetidas às provas bioquímicas do Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato (IMViC). Aquelas que apresentavam nestes teste um resultado ++ -- ou - + -- foram consideradas *Escherichia coli* típica e atípica, respectivamente.

A análise estatística comparou a eficiência das metodologias para o isolamento de *P. aeruginosa*. Para tal utilizou-se o teste "Z" para comparação entre proporções.

Para a enumeração de coliformes fecais, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas de médias, contido no Statistical Analysis System (SAS Institute, 1982) ao nível de 0,01 de probabilidade.

Resultados

Os percentuais de amostras que apresentaram-se positivas na pesquisa de *P. aeruginosa*, com o uso do Caldo Verde Malaquita na fase de enriquecimento seletivo, no 1^o, 7^o e 15^o dias foi de 40%, 43,3% e 30%, respectivamente. Já pelo plaqueamento direto em Ágar Cetrimide, foram obtidos apenas 3 resultados positivos durante todo o experimento. Um no 7^o dia à temperatura de 4°C e dois no 15^o dia à temperatura de 37°C.

Por meio do teste "Z" para comparação entre proporções, observou-se que o uso do Caldo de Verde Malaquita para enriquecimento é o mais indicado, pois foi o que apresentou melhores resultados no isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Nas amostras positivas para coliformes fecais, a única espécie isolada foi a *Escherichia coli*.

No 1^o dia, os valores do número mais provável (NMP), conforme tabela de McCrady, de coliformes fecais/g de amostra variaram entre 4 a > 1100 nas amostras positivas. No 7^o dia, a variação ficou entre 4 a 93 e no 15^o dia entre 7 a > 1100. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que esta variação entre os dias não foi significativa. O número de amostras positivas e seus percentuais são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Número de amostras positivas para coliformes fecais e seus percentuais nos diferentes dias de estocagem a $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Dias de estocagem	Amostras positivas (%)
1 ^o	14 (46,67 %)
7 ^o	10 (33,33 %)
15 ^o	13 (43,33 %)

No 1^o dia, 4 amostras positivas para coliformes fecais se apresentaram acima do padrão $10^2/\text{g}$ estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, 1981 (Silva e Oliveira, 1984). No 7^o dia nenhuma amostra se revelou acima do padrão e no 15^o dia, amostras apresentaram valores acima do padrão.

Discussão e conclusões

Neste trabalho foi isolada a *P. aeruginosa* a partir de amostras de carne de rã, durante os três dias de estocagem em refrigeração. Diversos autores, segundo Leitão (1977), demonstraram o isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas* a partir de amostras de pescado, onde lembramos que a rã é assim classificada no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1952).

Conforme a análise estatística, o enriquecimento seletivo, utilizando o Caldo Verde Malaquita, foi o método de melhor eficiência para a pesquisa de *P. aeruginosa*. Este caldo inibe a microbiota acompanhante e dessa forma, a *P. aeruginosa* cresce praticamente sem nenhum impedimento. A incubação a 37°C apresentou maior facilidade para o crescimento do germe, quando da análise das UFCs no meio de plaqueamento. Entretanto, nesta temperatura ocorreu apenas uma variação, no isolamento, de 2% a mais em relação a 42°C .

Gram (1993) esclarece que as espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas* são microrganismos deterioradores importantes em muitos produtos refrigerados e se tornam a microbiota predominante nos mesmos. Acredita-se que isto seja ocasionado pelo seu rápido crescimento em temperatura de refrigeração. Freedman et al. (1989) destacam a produção de proteases e lipases por *Pseudomonas*, resultando em deterioração. Desse modo, conforme os autores citados, observamos que a pesquisa de *P. aeruginosa* merece destaque no controle de qualidade de alimentos refrigerados.

Por serem as *Pseudomonas* bactérias oportunistas, elas podem determinar infecções nas diferentes classes de

ingestores (imunodeprimidos, idosos, crianças e pessoas com deficiência enzimática) que ao utilizarem a carne de rã como tratamento medicinal alternativo (naturismo), objetivando a cura de seus males, podem ser infectadas comprometendo seriamente o organismo. Com base neste relato, o que consta no anexo II da portaria 001 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (Brasil, 1987) deve ser levado em consideração, pois explicita que todo alimento contaminado com esta microbiota patogênica pode ser um produto potencialmente capaz de causar toxinfecção alimentar.

Franco e Oliveira (1986) encontraram uma média de 2 coliformes fecais/g a partir de amostras de carne de rã (*R. catesbeiana*) congelada. Rodrigues et al. (1994) encontraram uma percentagem de contaminação por coliformes fecais em 25 (83%) das amostras de carne de rã (*Leptodactylus* sp) congelada, com média de 506 coliformes fecais/g. Na presente pesquisa, encontrou-se uma média de valores para coliformes fecais no 1^o, 7^o e 15^o dias acima daqueles encontrados por Franco e Oliveira (1986), sendo que o percentual de amostras positivas para coliformes fecais nos três dias foi inferior ao encontrado por Rodrigues et al. (1994). A enumeração de coliformes fecais visava caracterizar as condições higiênico-sanitárias do produto. De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que os produtos que apresentaram valores acima do padrão estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (Silva e Oliveira, 1984) encontram-se fora dessas condições.

A diminuição do NMP de coliformes fecais no 7^o dia pode indicar a inibição dos mesmos pela *P. aeruginosa*, uma vez que este dia apresentou o maior percentual de amostras positivas para a mesma. Segundo Gram (1993), a atividade antimicrobiana de *Pseudomonas* spp. é reconhecida como um fator de supressão de microrganismos patogênicos. Freedman et al. (1989) demonstraram ser a *P. aeruginosa* a espécie mais efetiva na inibição de vários microrganismos, inclusive a *E. coli*.

De acordo com os dados da análise estatística deste trabalho, qualquer um dos três dias se presta para a enumeração de coliformes fecais a partir de amostras de carne de rã resfriada. Os diferentes microrganismos presentes nas amostras deixam claro que podem ter ocorrido falhas durante o abate, processamento tecnológico e, ou armazenamento do alimento, servindo de alerta aos médicos veterinários higienistas de alimentos para que os diferentes pontos críticos existentes desde a rancultura até o produto final sejam observados e controlados com rigor. As análises de riscos e controle dos pontos críticos devem ser executadas objetivando levar ao mercado consumidor um alimento salubre.

Abstract

The present study reports on microbiological quality of frog meat. Samples were analyzed on the 1st, 7th and 15th days of storage ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). This research was carried out to verify the survey for *Pseudomonas aeruginosa*, compare methodology's efficacy about selective enrichment and direct plating, incubation's temperatures and verify the fecal coliforms' presence

in this kind of food. The percentage of positive samples for *P. aeruginosa* was 40%, 43,33% and 30%, respective of the 1st, 7th and 15th days. Concerning this days, the percentage for fecal coliforms was 46,67%, 33,33% and 43,33%. The data observed in this study indicated that selective enrichment was the more efficient method and the incubation at 37°C was the best to *Pseudomonas*' growing.

Keywords: frog; microbiology; methods.

Referências bibliográficas

- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Aprovado pelo Decreto nº 30691 de 29/03/52, alterado pelo Decreto nº 1255 de 25/06/62. Rio de Janeiro, 1952. 174 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos – DINAL. Padrões Microbiológicos para produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo. Portaria nº 0001 de 28 de janeiro de 1987. *Diário Oficial*, Brasília, DF, 12 fev. 1987, p. 2197-2200. Seção I.
- FABICHAK, I. *Criação racional de rãs*, 1. ed. Nobel, São Paulo, 69 p. 1989.
- FRANCO R.M., OLIVEIRA L. A.T.. Avaliação bacteriana de carne de rã touro gigante (*Rana catesbeiana*, Shaw) congelada. In *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. Anais, Cuiabá-MT, 366 p. 1986.
- FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C.. *Microbiología de los alimentos*, 4. ed. Editorial Acribia, Zaragoza, 681 p. 1993.
- FREEDMAN, D.J., KONDO, J.K., WILLRETT, D.L. Antagonism of foodborne bacteria by *Pseudomonas* spp.: a possible role for iron. *J Food Prot*, v. 52, n. 7, p. 484-489. 1989.
- GRAM, L. Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Appl Environ Microbiol*, v. 59, n. 7, p. 2197-2203. 1993.
- HITCHINS, A.D., HARTMAN, P.A., TODD, C.D. Coliforms - *Escherichia coli* and its toxins. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. 3. ed., APHA, Washington, 1912 p. Cap. 24, p. 325-345. 1992.
- JOHNSON, E.A. Infrequent microbial infections. In: CLIVER, D.O. *Foodborne diseases*. Academic Press, San Diego, 395 p. Cap. 19, p. 260-275. 1990.
- LEITÃO, M.F.F. Microbiologia do pescado e controle sanitário no processamento. *Boletim do ITAL*, v. 50, mar./abr. 1977.
- MERCK, E. *Manual de Medios de Cultivo - División Diagnósticos*. Barcelona, 356 p. 1990.
- PALLERONI, N.J. Gram negative aerobic rods and cocci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 2 v., v. 1. Sec 4. 1984.
- RODRIGUES, R.L., LEITE, M.O., FRANCO, R.M., OLIVEIRA, L.A.T. Avaliação bacteriológica de carne de rã (*Leptodactylus* sp) congelada, comercializada em Niterói-RJ. *Hig Alim*, v. 8, n. 31, p. 19-24. 1994.
- SAS Institute - *User's guide statistics*. Cary:SAS, 1982.
- SILVA, D.L. Mercado de rãs no Brasil. In: First International meeting on frog research and technology e VIII ENAR. Anais, Viçosa, p. 23-25. 1995.
- SILVA, N.R., OLIVEIRA, L.A.T. Ocorrência de *Salmonella* na carne de rã (*Rana catesbeiana* - Shaw, 1803). *Hig Alim*, v. 31, p. 36-40. 1984.

CETUS

NIKON (Japão)
Distribuidor Nacional

Cetus Hospitalar Comércio e Representações Ltda.

**Microscópios Biológicos e Industriais - Espectrofotômetros -
Deonizadores - Kits para bioquímica - Contador de Células
Assistência Técnica**

Rua Lopes Trovão, 75 - Benfica
20920-310 - Rio de Janeiro - RJ
Tel.: (021) 568-9345
Fax: (021) 264-3628
E-mail: cetus@abeunet.com.br