

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

MYCHELLE TURETA WRONSKI

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO, SOLO E HORTALIÇAS
ORGÂNICAS DE DUAS PROPRIEDADES DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

PROJETO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2018

MYCHELLE TURETA WRONSKI

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO, SOLO E HORTALIÇAS
ORGÂNICAS DE DUAS PROPRIEDADES DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

Projeto de trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Shioji Tiومان.

TOLEDO

2018

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

MYCHELLE TURETA WRONSKI

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO, SOLO E HORTALIÇAS
ORGÂNICAS DE DUAS PROPRIEDADES DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus Toledo* e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof^a Dr^a Tatiana Shioji Tiunan
UTFPR Toledo
Orientadora

Prof^a Dr^a Priscila Vaz de Arruda
UTFPR Toledo
Avaliadora

Dr^a Caroline Mariana de Aguiar
UTFPR Toledo
Avaliadora

Toledo, novembro de 2018.

OBS: O Termo de Aprovação assinado está na coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Tatiana Shioji Tiunan por ter me orientado no desenvolvimento dessa pesquisa.

Dedico a minha família, amigos e professores por toda a colaboração e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A demanda de hortaliças aumentou no Brasil e a procura por um produto saudável e de qualidade ampliou o mercado orgânico. A alface (*Lactuca sativa* L.) e a couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) são hortaliças muito populares e apreciadas no país, sua higiene é muito importante por serem alimentos de consumo cru. A verificação de contaminação microbiológica não é um assunto que se tornou muito conhecido no país. A higiene de alimentos de consumo cru é muito importante, portanto o objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade do consumo de hortaliças orgânicas, identificando a presença de coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., além de averiguar o potencial de inibição do vinagre de álcool. Foram coletadas amostras de água de irrigação, solo e hortaliças de duas hortas de cultivo orgânico localizadas no oeste do Paraná. Para as análises que foram realizadas em Toledo – PR, o método dos Tubos Múltiplos, teste de identificação bioquímica de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. e teste antimicrobiano com diferentes concentrações de vinagre de álcool foram utilizados. Dentre as hortaliças, na alface de uma das hortas excesso de coliformes totais e termotolerantes foi encontrado, indicando que o produto estava impróprio para consumo. As amostras de água apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes e uma delas estava contaminada com *Salmonella* spp. Já o solo da couve de uma das hortas e mostrou infectado por *E. coli*. As demais amostras apresentaram resultados correspondentes aos previstos por lei, para hortaliças consumidas cruas até 100 NMP g⁻¹ e água para irrigação 2 NMP g⁻¹ de coliformes termotolerantes presentes. Quanto a utilização do vinagre para a inibição de microrganismos se provou eficiente a partir da concentração de 3,33% (V/V) e o seu uso pode ser feito pelos produtores ou recomendado aos consumidores. A contaminação de solos e água de irrigação podem transferir microrganismos patogênicos ao vegetal durante seu desenvolvimento, por isso a manipulação desses vegetais no campo e a adequada limpeza e desinfecção na casa do consumidor é muito importante para manter o produto viável para consumo.

Palavras-chave: Alface; Couve; Vinagre.

ABSTRACT

The demand for vegetables increased in Brazil and the search for a healthy and quality product expanded the organic market. The lettuce (*Lactuca sativa L.*) and kale (*Brassica oleracea var. acephala*) are very popular and appreciated vegetables in the country, their hygiene are very important because they are consumed raw. The verification of the microbiological contamination is not a well-known subject in the country. The hygiene of raw consumed vegetables is very important, therefore, the purpose of this paper was to verify the viability of organic vegetables identifying the presence of total and thermotolerant coliforms, *E. coli* and *Salmonella* spp. besides ascertain the potential of alcohol vinegar for inhibition. Irrigation water, soil and vegetables samples were collected from two gardens of organic production located in western Paraná. For the analyzes that were carried out in Toledo – PR The Multi-Tube Method, biochemical test for *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. and antimicrobial test with different concentrations of alcohol vinegar were used. Among the vegetables, the lettuce from one of the garden's an excess amount of total and thermotolerant coliforms were found, indicating that the product was not good for consumption. The water samples were contaminated with thermotolerant coliforms and one of the samples had *Salmonella* spp. in it. On the other hand the Kale soil sample from one garden was infected with *E. coli*. The other samples showed results for thermotolerant coliforms corresponding to those foreseen by law of 100 MPN g⁻¹ and 2 MPN g⁻¹ for consumed raw vegetables and irrigation water respectively. The use of vinegar for the inhibition of microorganisms proved to be efficient from the concentration of 3,33% (V/V). Soil contamination and irrigation water can migrate pathogenic microorganisms to the plant during its development, therefore to keep the product viable to consume the manipulation of these vegetables until they get to the consumer's house is very important.

Key-words: *Lettuce; Kale; Vinegar.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	10
1.1.1	Objetivo Geral	10
1.1.2	Objetivos Especificos	10
1.2	JUSTIFICATIVA	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Microbiologia dos vegetais	10
2.2	Microrganismos indicadores e <i>Salmonella</i> spp.	11
2.3	Alface crespa (<i>Lactuca sativa</i> L.)	13
2.4	Couve manteiga (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>)	13
2.5	Água de irrigação	14
2.6	Solo	15
2.7	Ácido Acético (Vinagre)	16
2.8	Meios de cultura e provas bioquímicas	16
2.9	Técnicas de quantificação e identificação de microrganismos	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Amostras	20
3.2	Determinação de coliformes totais e termotolerantes	22
3.2.1	Teste presuntivo	22
3.2.2	Teste confirmativo	23
3.2.3	Teste confirmativo para coliformes termotolerantes	24
3.2.4	Teste de confirmação para <i>Escherichia coli</i>	25
3.2.5	Teste de confirmação para <i>Salmonella</i> spp.	26
3.2.6	Testes bioquímicos de identificação de microrganismos	27
3.3	Teste de sensibilidade ao vinagre	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5	CONCLUSÃO	32
6	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A demanda de hortaliças aumentou devido à mudança nos hábitos alimentares dos brasileiros, que se preocupam com uma alimentação saudável e exigem um produto de qualidade (COSTA et al., 2012). Sendo assim, a microbiota de hortaliças torna-se um fator muito importante a ser considerado pelo fornecedor e pelo consumidor, principalmente as hortaliças mais consumidas como a alface crespa e a couve manteiga.

A alface crespa (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça muito popular, tendo seu consumo elevado devido ao seu sabor suave e seu baixo custo produtivo e aquisitivo (SANTANA et al., 2006). A couve manteiga (*Brassica oleracea*) é uma hortaliça arbustiva cujo consumo tem aumentado significativamente devido as suas propriedades nutritivas, farmacêuticas e culinárias (NOVO et al., 2010).

Como o consumo desses vegetais é de forma crua, há uma preocupação com a contaminação microbiológica que pode causar intoxicações alimentares. Esses microrganismos podem estar presentes em água de irrigação, no adubo de dejetos fecais e no solo. Porém, na maioria das vezes a contaminação das hortaliças ocorre durante o manuseio e conservação do alimento (PAIVA, 2011).

As informações sobre a qualidade higiênico-sanitária das hortaliças são importantes e devem ser garantidas uma vez que a higiene e os desinfetantes utilizados devem garantir a completa remoção ou redução da microbiota presente no produto sem alterar as características do mesmo (COSTA et al., 2012). Segundo o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos aprovado pela ANVISA indicado na Resolução nº12 de 2001, a quantidade máxima permitida de coliformes à 45°C é de 10^2 g⁻¹, enquanto para *Salmonella* spp. a cada 25 g de amostra a presença não é permitida. Esse regulamento é aplicado para hortaliças, legumes e similares frescas de consumo direto “in natura”.

O mercado de alimentos naturais sem agrotóxicos estão se destacando e tornando cada vez mais prestigiado no Brasil. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017): “... produto orgânico é aquele obtido em um sistema orgânico de produção agropecuária ou oriundo de processo extrativista sustentável e não prejudicial ao ecossistema local”. O desenvolvimento de vegetais naturais é um diferencial no mercado atual que em sua maioria, oferece

um produto que em alguma etapa de sua produção recebeu algum tipo de defensivo agrícola. Além de que, essas verduras também devem ter o controle da microbiota que pertencem.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiológica da água de irrigação, solo e hortaliças orgânicas de duas propriedades da região Oeste do Paraná.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar as condições de higiene da água aplicada na irrigação, o solo de cultivo e as hortaliças orgânicas (*Lactuca sativa L.* e *Brassica oleracea var. acephala*) utilizando a técnica do Número Mais Provável para coliformes totais e termotolerantes.
- Identificar a possível presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. nas amostras e se encontrados os microrganismos, verificar a atividade antimicrobiana do vinagre de álcool em cepas dessas duas bactérias.

1.2 JUSTIFICATIVA

A qualidade higiênico-sanitária das hortaliças é muito importante, pois microrganismos são percursoros de várias doenças, além de que são causadores da degradação rápida desses vegetais. Por essas razões se faz necessário o controle da quantidade de microrganismos para avaliar sua presença na água, no solo e nas próprias hortaliças. O processo de sanitização dos vegetais antes do consumo deve ser padronizado, procurando-se formas de destruir ou diminuir a microbiota presente no meio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microbiologia dos vegetais

Frutas e hortaliças apresentam na maioria das vezes condições ideais para sobrevivência e crescimento de vários tipos de microrganismos, isso porque, os tecidos internos dos vegetais são ricos em nutrientes (BARTH et al., 2009).

A ocorrência de microrganismos em alimentos é inevitável, principalmente em verduras e frutas que são alimentos frescos e dificilmente passam por algum tratamento, muitas vezes nem mesmo a desinfecção. Sendo assim, o risco de contrair doenças é grande. Pode-se perceber isso, pelo número alto de infecções documentadas associadas ao consumo de vegetais crus a alguns anos atrás (BUCK et al., 2003).

De acordo com Valsechi (2006) as características que influenciam na disseminação e sobrevivência dos microrganismos são principalmente o pH, a atividade de água e a temperatura. E para o controle da microbiota essas características são usadas a favor do ser humano.

O controle da microbiota presente é responsável pela duração, e qualidade desses vegetais. E é por isso que as etapas de controle de qualidade são tão importantes (BARTH et al., 2009).

2.2 Microrganismos indicadores e *Salmonella* spp.

A condição sanitária de vegetais pode ser verificada pela presença de microrganismos indicadores. Eles indicam a ocorrência de contaminação fecal, o potencial de deterioração de um alimento ou patógenos que podem causar alguma infecção. A constatação deles na planta é muito importante, pois pode indicar se alguma etapa do processo não segue o conjunto de normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Portanto, sua identificação é muito importante para garantir a segurança do produto e seu tempo de prateleira (FERREIRA et al., 2014).

A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) agrupa os microrganismos indicadores em: microrganismos que não oferecem risco à saúde (mesófilos, termófilos, bolores, leveduras e psicotróficos) e microrganismos que oferecem risco baixo ou indireto à saúde como coliformes totais e termotolerantes (FERREIRA et al., 2014).

Coliformes totais são bactérias gram-negativas com o formato de bastonete que fermentam a lactose a 35°C em até 48 horas. Sua identificação é

realizada pela produção de gás e elas podem se originar do trato gastrointestinal de animais de sangue quente ou podem ser naturais do solo (SANTOS, 2007).

Coliformes termotolerantes é um grupo de microrganismos representados pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiellae* etc., eles são capazes de fermentar a glicose e a lactose com produção de gás à 45°C, podem se originar do trato gastrointestinal (*E. coli*) ou podem ser de origem não fecal (*Enterobacter*, *Klebsiella*). Alguns desses microrganismos têm grande patogenicidade e por isso são perigosos aos humanos, o mais comum entre eles é a *E. coli* (SANTOS, 2007; BEZERRA, 2015).

O microrganismo predominante no grupo de coliformes termotolerantes é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa e a determinação de sua presença pode ser realizada pela indicação de ácido e gases que são produzidos quando esse microrganismos fermenta a glicose e a lactose a uma temperatura de 44,5°C. A *E. coli* é responsável por intoxicações alimentares, sendo assim necessário que o controle da bactéria e do processo seja feito (PEREIRA et al., 1999; SILVA et al., 2006; BEZERRA, 2015).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa encontrada no intestino e fezes de animais e humanos sendo a razão de graves infecções alimentares, o seu controle é difícil e isso gera um problema de Saúde Pública (BEZERRA, 2015). Segundo Maffei et al. (2013), este microrganismo tem maior incidência em vegetais de produção orgânica, pois a adubação é na maioria das vezes feita com fezes animais. Dessa forma, a desinfecção é uma etapa importante do processo tendo os ácidos orgânicos de cadeia curta apresentado eficiência contra *Salmonella* em alimentos. Dessa forma, o uso do vinagre pode ser considerado não apenas como um tempero, mas também antimicrobiano (KOYUNCU et al., 2013).

A demanda de alimentos de consumo cru tem aumentado significativamente, pois o consumo de frutas e vegetais “in natura” diminui o risco de contrair doenças. Portanto, a qualidade e segurança dos alimentos é muito importante para o consumidor que passou a considerar muito mais a aplicação de inseticidas, a qualidade microbiológica, as práticas higiênicas e a metodologia utilizada para a produção.

As hortaliças devem ser puras e saudáveis, pois elas possuem uma microbiota provinda do ambiente além de serem de consumo cru. A quantidade de

bactérias presentes em hortaliças é muito importante, pois muitos desses microrganismos são patógenos e podem causar enfermidades intestinais. O controle da produção deve ser realizado sob condições estritamente higiênicas, a fim de evitar quaisquer danos à saúde do consumidor (SARAIVA, 2013).

2.3 Alface crespa (*Lactuca sativa* L.)

A alface é uma das hortaliças folhosas mais consumidas do mundo e é muito popular no Brasil devido a seu baixo custo e o fato de apresentar baixo teor de calorias. Por ser uma hortaliça delicada ela tem certas desvantagens em sua produção e distribuição, como a necessidade de ter irrigação controlada, precisar de temperaturas agradáveis além de possuir durabilidade reduzida (VIDIGAL et al., 1995).

É uma herbácea rica em vitamina A e ainda fornece vitaminas B1, B2, C e sais minerais. O solo com grande quantidade de matéria orgânica e rico em nutrientes é favorável ao bom desenvolvimento dessa variedade (VIDIGAL et al., 1995; FERNANDES et al., 2002).

Por ser produzida com grande quantidade de água, solo rico e temperaturas amenas o desenvolvimento de microrganismos nesse vegetal é inevitável, o que pode causar a deterioração da planta e a intoxicação de consumidores (FERNANDES et al., 2002).

2.4 Couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

A couve é uma hortaliça arbustiva de caule ereto que não forma cabeça, com pecíolo longo, nervuras destacadas e apresentam folhas ao redor do caule. Ela é bastante apreciada pelos brasileiros por conter abundância em antioxidantes e sais minerais que ajudam na prevenção de doenças degenerativas. Além disso, possui alto valor nutricional e também contém fibras que contribuem no bom funcionamento do intestino (FILGUEIRA, 2013; SHINGO e VENTURA, 2009).

Seu desenvolvimento pode ser prejudicado por características extrínsecas como temperatura e atividade de água, é por essa razão que ela tem baixa durabilidade “in natura”. Todavia, os microrganismos também são responsáveis pela

deterioração e a contaminação dessa verdura, isso porque os maiores disseminadores de micróbios são o solo e a água e como essa hortaliça necessita de irrigação, temperaturas amenas e solos com elevada quantidade de matéria orgânica é impossível que não encontrar microrganismos nessa planta (EVANGELISTA, 2001; SHINGO e VENTURA, 2009).

Caso o desenvolvimento da planta não tenha esse controle de qualidade, a produção será comprometida e o produto resultante será de má qualidade, ainda mais se houver ocorrência de pragas no cultivo (FILGUEIRA, 2013).

2.5 Água de irrigação

A água é um recurso natural que passou a ser visto como recurso hídrico, disponível para a vida, o seu uso irracional e sua escassez é um dos assuntos mais preocupantes de toda a sociedade quando se pensa no futuro (BACCI; PATACA, 2008).

Segundo Almeida (2011), por ser um recurso essencial à vida, a água influencia diretamente o desenvolvimento, a qualidade de vida e a saúde humana. Para que isso ocorra, ela não deve apresentar características que possam prejudicar a saúde humana, porém, na atualidade existe certa dificuldade em encontrar recursos hídricos que não tenham sofrido nenhum tipo de alteração física, química ou biológica (RICHTER, 2009).

Dentre essas alterações, a biológica é uma das características que mais causam doenças e mortes no mundo, porque a água é um veículo para a disseminação dessas doenças. Sendo assim, a determinação do melhor tratamento para manter o controle de qualidade tanto da água como dos alimentos, é um dos muitos motivos para que análises de água sejam reproduzidas (PEREIRA, 1995; DIAS, 2008; ALMEIDA, 2011).

A contaminação dos alimentos está diretamente relacionada à água de irrigação, principalmente as hortaliças que são consumidas na forma crua. A água fora dos padrões pode comprometer a produção do alimento, causar efeitos indesejáveis no solo e na cultura, sendo importante para a identificação de áreas que talvez necessitem de um controle mais rigoroso (CANTU et al., 2015).

Segundo a resolução nº357 (CONAMA, 2005), existem vários tipos de água doce, elas são divididas em cinco classes que são: classe especial (água

destinada a preservação ambiental e consumo humano após desinfecção), classe I (águas para a proteção de comunidades aquáticas e Terras Indígenas, recreação, abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado, irrigação de hortaliças e frutas de consumo cru), classe II (abastecimento para consumo humano após tratamento convencional, recreação, proteção de comunidades aquáticas, irrigação de hortaliças e frutas com os quais o público possa vir a ter contato direto, aquicultura e pesca), classe III (indicadas à recreação, dessedentação de animais, pesca amadora, irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado) e classe IV (águas que só podem ser utilizadas para navegação e harmonia paisagística). Por essa razão, somente águas de classe I e II podem ser destinadas a irrigação de hortaliças e o Poder Público é o responsável pela avaliação da qualidade da água, os agricultores não são obrigados a fazer essa análise. A norma também estabelece que águas doces de classe I devem apresentar um número máximo de 2 NMP mL⁻¹ de coliformes termotolerantes presentes.

Como a agricultura irrigada depende tanto da qualidade quanto da quantidade de água, esse controle é necessário para que se mantenham os parâmetros de qualidade. Porém, a qualidade da água de rios, hoje em dia é bem rara, já que em algumas décadas a produção aumentou significativamente e com uma maior demanda a quantidade diminuiu a ponto de se necessitar recorrer a águas de qualidade inferior (SILVA et al., 2011).

2.6 Solo

O solo é um dos componentes mais importantes para os seres vivos e sua utilização negligenciada é preocupante já que a sociedade desvaloriza sua conservação. Essa desconsideração é uma das razões pelas quais o solo hoje em dia apresenta problemas como erosão, poluição e etc. (BOAS e MOREIRA, 2012).

Os microrganismos são indispensáveis no solo, pois eles são responsáveis pela manutenção e sobrevivência de animais e plantas, só que são geralmente esquecidos pelo fato de não podermos vê-los e por isso são tratados com descaso (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; BOAS e MOREIRA, 2012).

Como Louis Pasteur dizia: “O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”. O grupo de microrganismos que está em maior quantidade

presente no solo é o das bactérias. As funções deles são principalmente a decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia e etc. (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Pode-se afirmar então, que o cuidado com o solo em que produzimos alimentos para nosso consumo é de extrema importância e sua manutenção deve ser feita regularmente para a obtenção de um alimento de qualidade.

2.7 Ácido Acético (Vinagre)

O ácido acético, mais conhecido popularmente como vinagre, é um composto que tem várias aplicações na indústria. Esse solvente é obtido pela oxidação do álcool etílico realizada pela bactéria *Acetobacter aceti* e é utilizado como condimento para saladas (UTYAMA et al., 2007).

O provável mecanismo de atividade antimicrobiana do ácido acético é que ele age na parede celular de microrganismos. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são diferentes e em relação à parede celular, as bactérias Gram-positivas tem espessura muito maior do que as Gram-negativas, tornando-as muito mais resistentes à pressão e insolúveis em álcool. O conhecimento sobre esse mecanismo ainda é limitado, porém, cientistas suspeitam que a quantidade de proteínas e lipídeos presentes na parede celular interferem na atividade antimicrobiana do vinagre (UTYAMA et al., 2007).

O pH ótimo de crescimento para microrganismos como coliformes fecais está entre 6,5 e 7,5, enquanto o vinagre geralmente apresenta pH entre 2 e 3 conforme a legislação brasileira (EMBRAPA, 2006). Essa diferença de pH afeta no desenvolvimento das bactérias, portanto pode causar a diminuição ou eliminar completamente o teor de microrganismos presentes em alimentos, garantindo a desinfecção e evitando a intoxicação do consumidor (UTYAMA et al., 2007).

2.8 Meios de cultura e provas bioquímicas

Caldos e ágaros são meios de cultura utilizados para realização de análises biológicas. Eles podem ser meios de pré-enriquecimento, enriquecimento, diferenciais, seletivos, triagem, identificação, dosagem, contagem e estocagem ou manutenção.

A água peptonada é um meio de pré-enriquecimento utilizada para amostras que passaram por algum tipo de tratamento térmico ou químico. Ela tem grande utilização na diluição de amostras sólidas para a realização de testes biológicos, pois ela aumenta a quantidade de bactérias presente na amostra ou leva as bactérias a expressarem completamente sua atividade metabólica.

Os caldos Lauril Triptose (LTB) e Verde Bile Brilhante 2% (VBB) são meios de enriquecimento utilizados na técnica de identificação de coliformes em análises de água e alimentos. O meio LTB, também chamado de caldo Lauril Sulfato, permite que “lentos fermentadores de lactose” rapidamente aumentem a produção de gás e inibe outros microrganismos não pertencentes ao grupo de coliformes, obtendo-se um resultado mais rápido. Já o meio VB é utilizado para confirmar o resultado do teste presuntivo realizado com caldo LTB, a bile bovina e o verde brilhante presentes nesse caldo inibem as bactérias Gram-positivas e muitas Gram-negativas que não são coliformes (NEOGEN, 2010).

O Meio EC é um meio seletivo empregado no teste para coliformes fecais, inibindo bactérias formadoras de esporos e propiciando o crescimento de *E. coli* à 45°C. Ele não deve ser usado para isolamento direto de coliformes, o enriquecimento prévio no meio presuntivo é necessário para ótima recuperação dos coliformes fecais. O teste do Número Mais Provável (NMP) é usado para coliformes fecais com esse meio e ele é utilizado em métodos para testes em água e alimentos (NEOGEN, 2015).

O Método dos Tubos Múltiplos que se realiza em triplicata e com 3 diluições diferentes, pode ser aplicado com os caldos LTB, VBB e EC na identificação da presença de coliformes totais e termotolerantes.

O caldo de enriquecimento utilizado para recuperação de *Salmonella* spp. é o Tetrionato (TT). Ele é empregado no processamento de culturas fecais para bactérias e na detecção de *Salmonella* em alimentos, pois ele enriquece bacilos tifoides e paratífoides enquanto inibe coliformes. Esse meio é incorporado com iodo que inibe a flora intestinal normal de espécies fecais (NEOGEN, 2014).

Para o isolamento e diferenciação de bacilos entéricos ágar Eozina Azul de Metileno Holt (EMB) é utilizado. Ele é um meio seletivo, pois possui um inibidor e diferencial que permite apenas alguns microrganismos a fermentar carboidratos absorvendo complexo de Eosina Y e Azul de Metileno, esses dois compostos são corantes que quando combinados têm pH muito baixo, assim, fermentadores de

lactose (*Escherichia coli*), formam colônias com brilho verde metálico. Esses corantes também são inibidores de bactérias Gram-positivas (NEOGEN, 2011).

De acordo com Neogen (2008) o isolamento e a diferenciação de patógenos entéricos podem ser feitos usando-se Ágar Hektoen Entérico (HE). Ele é um meio seletivo bastante empregado na diferenciação de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp, seu grande potencial de isolamento foi atingido pelo aumento de peptona e carboidrato no meio, neutralizando-se assim os sais biliares e indicadores que têm efeito inibitório.

O caldo Mueller Hinton é empregado na determinação da susceptibilidade de microrganismos contra agentes antimicrobianos. Ele é utilizado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (IMC) de antimicrobianos para as bactérias aeróbicas (CASALAB, 2018).

Segundo Lázaro et al. (2008) o indol, ácido pirúvico e amônia são produtos metabólicos da degradação do aminoácido triptofano, essa degradação ocorre através da enzima triptofanase que algumas bactérias possuem. Quando o indol reage com o reagente de Kovacs forma um anel rosado na superfície do meio, provando que a bactéria converte o triptofano em produtos metabólicos. Se o reagente de Kovacs não mudar de cor o resultado é negativo.

O teste do Vermelho de Metila (VM) identifica a produção de ácidos fortes a partir da glicose. Nessa prova o VM detecta a grande quantidade de produtos ácidos finais. Quando o pH está 4 o reagente vira para vermelho indicando reação positiva. O indicador muda para amarelo se o pH for 6, apontando prova negativa.

Já o teste de Voges-Proskauer (VP) indica a produção de acetoina a partir da glicose, ou seja, produtos finais não ácidos ou neutros. O reagente de Barrit's permite detectar a presença de acetilmetilcarbinol, formando um complexo rosa avermelhado após 15 minutos de reação, essa cor representa uma prova positiva, já a ausência dessa cor é uma prova negativa. Os testes de VM e VP são contrários, portanto se para o VP o resultado for negativo, VM deve ser positivo (LÁZARO et al., 2008).

A prova do citrato é utilizada para a identificação de microrganismos que tem capacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono ocorrendo várias reações até a formação de carbonato de sódio, um produto alcalino que faz o pH virar e o indicador presente no meio virar da cor verde para azul forte. Sendo

positivo quando se torna azul e negativo quando não muda de cor (verde) (LÁZARO et al., 2008).

O meio tríplice açúcar ferro (TSI) é utilizado para a identificação de bastonetes Gram-negativos que produzem H₂S e fermentam glicose, lactose e sacarose. A *Salmonella* spp. é um microrganismo que fermenta a glicose deixando o cilindro do meio amarelo (ácido), base negra e produção de Sulfeto de Hidrogênio causando bolhas ou rachaduras no meio. Essas características após 18h de incubação indicam resultado positivo para esse microrganismo (LÁZARO et al., 2008).

2.9 Técnicas de quantificação e identificação de microrganismos

Existem vários métodos de identificação e quantificação de microrganismos, devido a grande quantidade de microrganismos presentes no meio ambiente, para tal é necessária a utilização de caldos e ágaros que selecionam os microrganismos de interesse.

Para bactérias do tipo coliformes a identificação pode ser realizada aplicando-se o método dos Tubos Múltiplos, esse método faz o uso de meios de enriquecimento e seleção que inibem o crescimento de várias bactérias indesejadas a fim de verificar a presença dos coliformes com turvação e formação de gás em tubo de Durham, além disso, sua quantificação também pode ser realizada por esse método que calcula o Numero Mais Provável (NMP) de bactérias presente em cada grama de amostra considerando 3 diluições diferentes. Esse método é eficaz e simples, o que faz com que seja um dos mais utilizados na constatação de coliformes totais e termotolerantes (FUNASA, 2013).

Para bactérias específicas como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. existem metodologias específicas, como são bactérias que toleram temperaturas de 40 a 45 °C a utilização de meios seletivos nessas temperaturas possibilita o isolamento e identificação desses microrganismos, juntamente com a confirmação pela aplicação de provas bioquímicas (OLIVEIRA, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

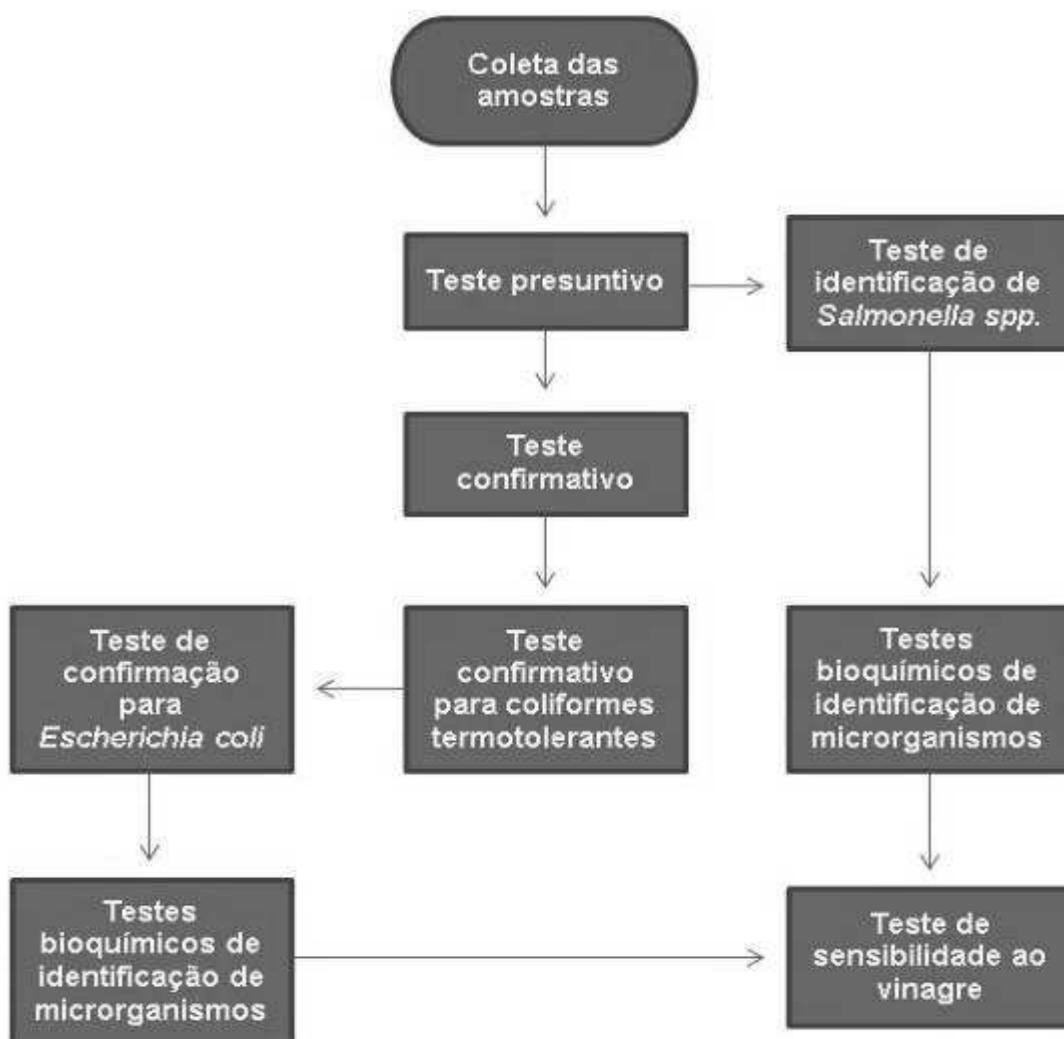
A coleta das amostras foi realizada em duas hortas de uma mesma empresa da cidade de Foz do Iguaçu. A realização da coleta da água de irrigação das Hortas 1 e 2, ocorreu primeiramente com a lavagem das mãos do coletor, para posterior vestimenta de luvas e lavagem das mesmas com água corrente e sabão, por fim a desinfecção com álcool 70% foi realizada, a coleta da água de rio na Horta 1 foi realizada em torneira que foi previamente higienizada com a álcool e após, acionada por 2 minutos para enfim a coleta em um frasco previamente esterilizado por 15 minutos em autoclave e aproximadamente 350 mL de amostra foi coletada. Já com outro frasco, a coleta da amostra da água da Horta 2 que é proveniente de nascente foi realizada em um cano que leva a água de um reservatório para outro, depois de preencher cerca de $\frac{3}{4}$ do frasco. Logo após a coleta de cada amostra, uma tira de papel alumínio foi colocada entre a boca e a tampa do frasco, ele foi tampado e por fim, um pedaço de papel alumínio foi colocado por cima da tampa e os frascos acondicionados em gelo. O teste dos Tubos Múltiplos foi aplicado para cada uma das duas amostras da água de irrigação para identificação de coliformes totais e termotolerantes, bem como testes para verificação de presença de *E. coli* e *Salmonella* spp.

Já para as amostras de hortaliças, foram utilizados ao todo 4 frascos antecipadamente esterilizados em autoclave para coleta, desses, dois foram usados para a coleta da alface e a couve da Horta 1, e os outros dois para a alface e a couve da Horta 2 em um único experimento. Realizando-se sempre a troca de luvas e sanitização das mesmas com álcool 70% para cada coleta foram recolhidas aproximadamente 100 gramas de cada amostra de hortaliça tomando o cuidado de coletar uma amostra que representasse o todo do vegetal, ou seja, folhas da base, meio e topo do vegetal foi recolhido e picado com as mãos para caber no frasco, após, tiras de alumínio foram colocadas entre a tampa e a boca do recipiente e por cima da tampa, as amostras foram mantidas em caixa térmica com gelo até a chegada ao laboratório para a realização do Teste dos Tubos Múltiplos para determinação de coliformes totais e termotolerantes e testes de verificação de presença de *E. coli* e *Salmonella* spp..

Após a coleta das hortaliças, foi recolhida amostras do solo de onde foram retirados esses vegetais, exemplo: o recolhimento da amostra de alface da horta 1 foi realizado, após esse recolhimento o coletor trocou de luvas realizando a higienização das mesmas com água corrente, sabão e por ultimo álcool 70%, para em seguida colher com as mãos cerca de 100 gramas de solo de onde havia sido coletada a alface. O papel alumínio foi utilizado para cobrir a boca e a tampa do frasco, até a chegada ao laboratório para a realização dos testes dos Tubos Multiplos e identificação de *E. coli* e *Salmonella* spp. esses frascos foram armazenados em caixa térmica com gelo. Essa coleta foi realizada nas duas hortas para os solos de onde foram retirados o alface e a couve das Hortas 1 e 2. O tempo da coleta até o início dos ensaios foi de 6 horas.

Portanto, ao todo foram 10 amostras que foram analisadas e a execução dessas análises ocorreu na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo, no laboratório de Microbiologia, onde todas as análises dispuseram de tubos e placas de controle para a confiança dos resultados. A ordem das análises está ilustrada na Imagem 1.

Imagem 1: Fluxograma de todas as análises realizadas



Fonte: Autoria própria (2018)

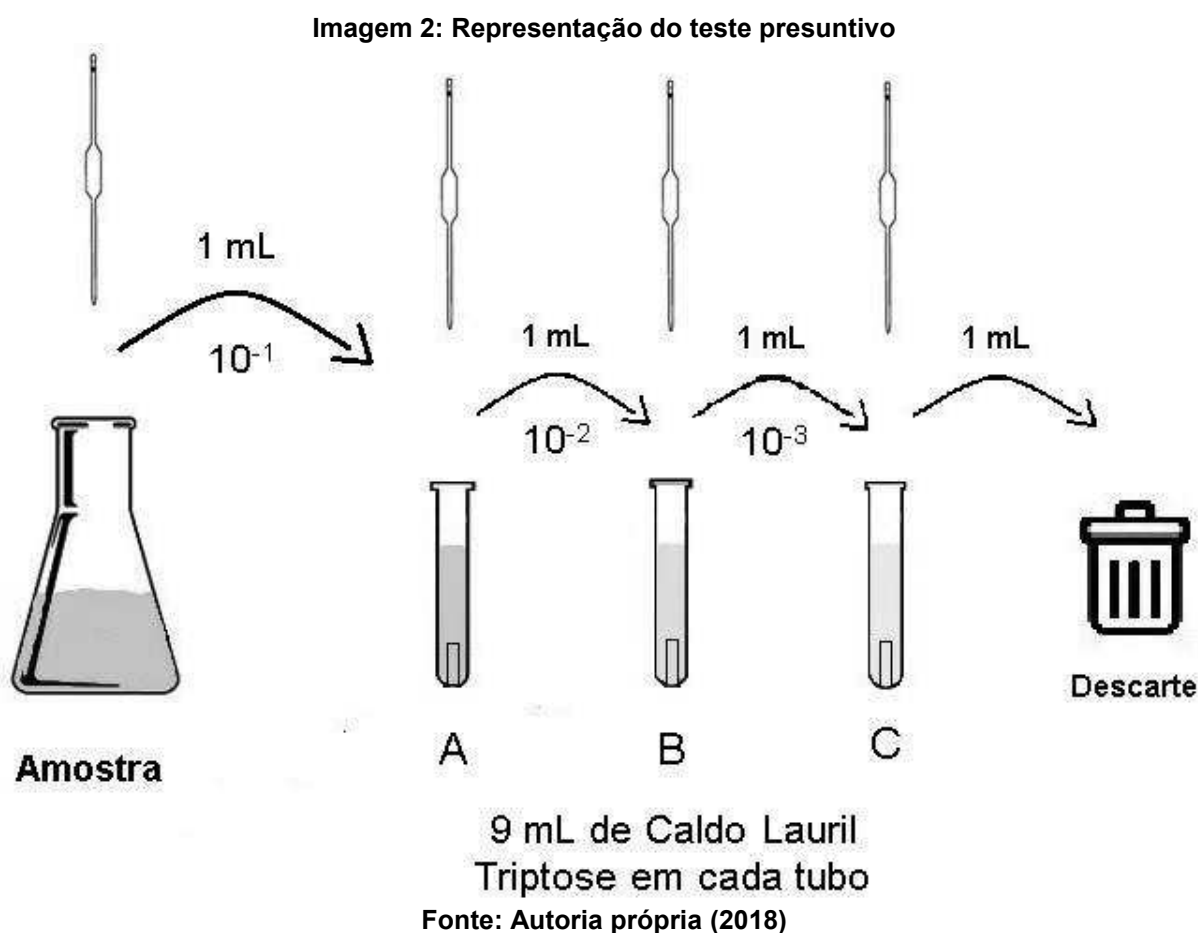
3.2 Determinação de coliformes totais e termotolerantes

3.2.1 Teste presuntivo

Para a aplicação do método dos Tubos Múltiplos, ao todo foram utilizados 9 tubos de ensaio e 9 tubos Durham para a realização da análise em triplicatas. Para tanto, 25 g de cada amostra foram diluídas em 225 mL de água peptonada tamponada para a realização das análises, obtendo-se a diluição 1:10.

Em cada um dos três primeiros tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo Lauril Triptose foi inoculado com auxílio de uma pipeta, 1 mL da amostra da diluição 1:10 perfazendo a diluição 1:100 (grupo a). Em seguida, em mais três tubos (grupo b) foi inoculado dos 3 primeiros tubos (grupo a), 1 mL de amostra em cada tubo,

obtendo a diluição 1:1000. E por fim, 1 mL de cada um dos 3 tubos do grupo b foram inoculados em 3 tubos (grupo c). Desta forma, obteve-se uma série em triplicata de tubos contendo as amostras nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000, como mostra a Imagem 2 (FUNASA, 2013).



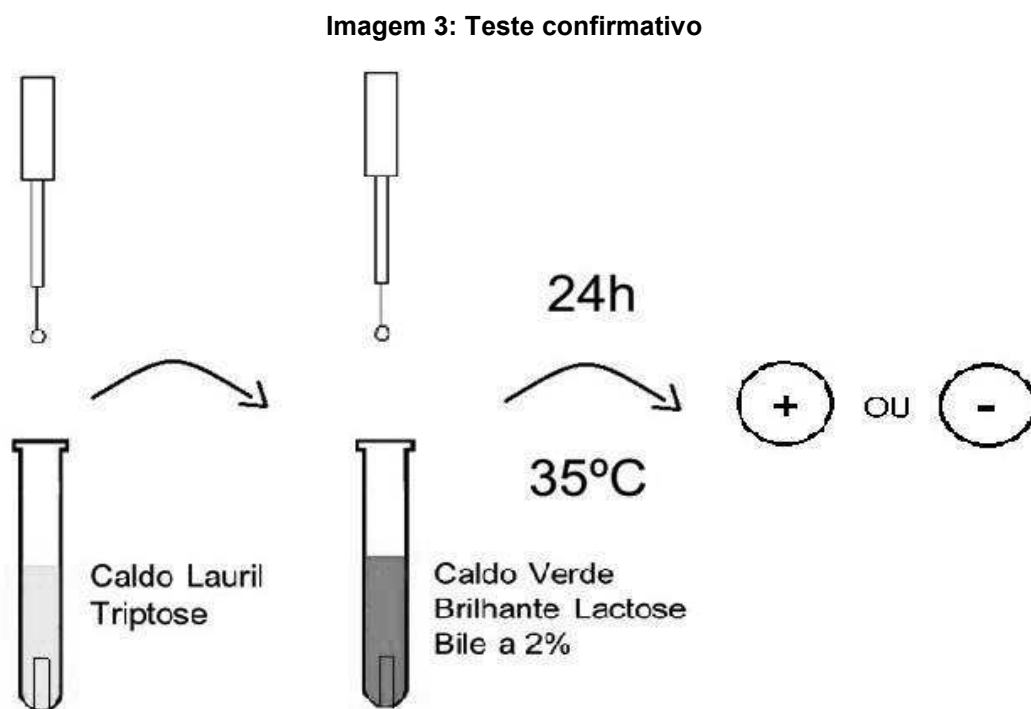
O controle da temperatura foi mantido em estufa por um período de 48 horas a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Incubou-se tubos contendo apenas meio de cultura como controle negativo.

O resultado foi considerado positivo quando houve turvação e formação de gás no tubo de Durham após 48h, sendo necessário um teste de confirmação com Caldo Verde Bile Brilhante 2%. Porém, o exame foi finalizado para os tubos em que não houve turvação e produção de gás no tubo de Durham (FUNASA, 2013).

3.2.2 Teste confirmativo

Os tubos que foram identificados positivos no teste presuntivo foram utilizados para a confirmação (Imagem 3) que foi realizada por repique com alça de

níquel cromo em Caldo Verde Bile Brilhante 2%. Após o repique, os tubos foram levados até a estufa e permaneceram à uma temperatura de $35 \pm 0,5$ °C por 24h. Os tubos que tiveram formação de gás e turvação foram considerados positivos sendo confirmada a presença de coliformes totais nas amostras. Já os tubos em que não houve turvação ou formação de gás, o resultado foi considerado negativo para coliformes (FUNASA, 2013).

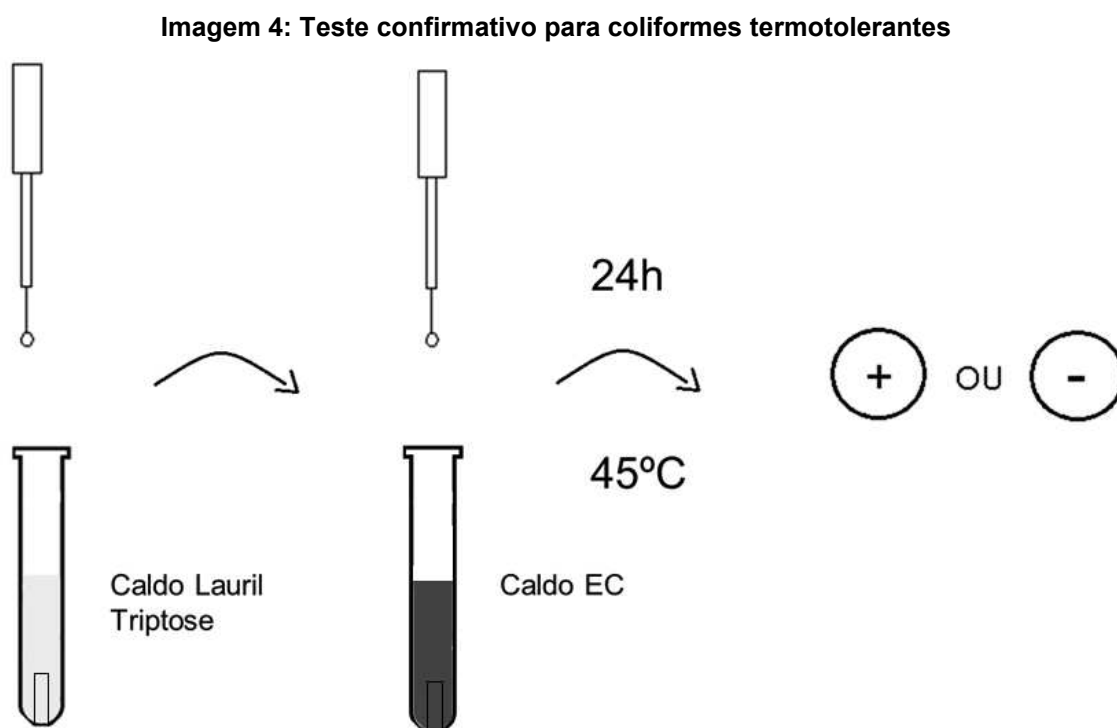


Fonte: Autoria Própria (2018)

3.2.3 Teste confirmativo para coliformes termotolerantes

A partir dos tubos de resultado positivo em que houve crescimento após 48 horas do teste presuntivo, foi transferido para tubos de ensaio contendo tubo de Durham o meio EC, com o auxílio de uma alça de níquel cromo flambada e fria, uma porção das amostras que foi homogeneizada. Todos os tubos permaneceram em banho de água que estava em temperatura ambiente por 30 minutos até a água atingir 45°C. Em seguida mantendo os tubos ainda em banho água à 45°C a incubação foi realizada durante 24 horas. Os tubos que tiveram a formação de gás e turvação foram considerados positivos para coliformes termotolerantes e encaminhados para o teste de confirmação de presença de *Escherichia coli*. Para os

tubos que tiveram resultado negativo as análises foram interrompidas (FUNASA, 2013). A Imagem 4 representa a análise.

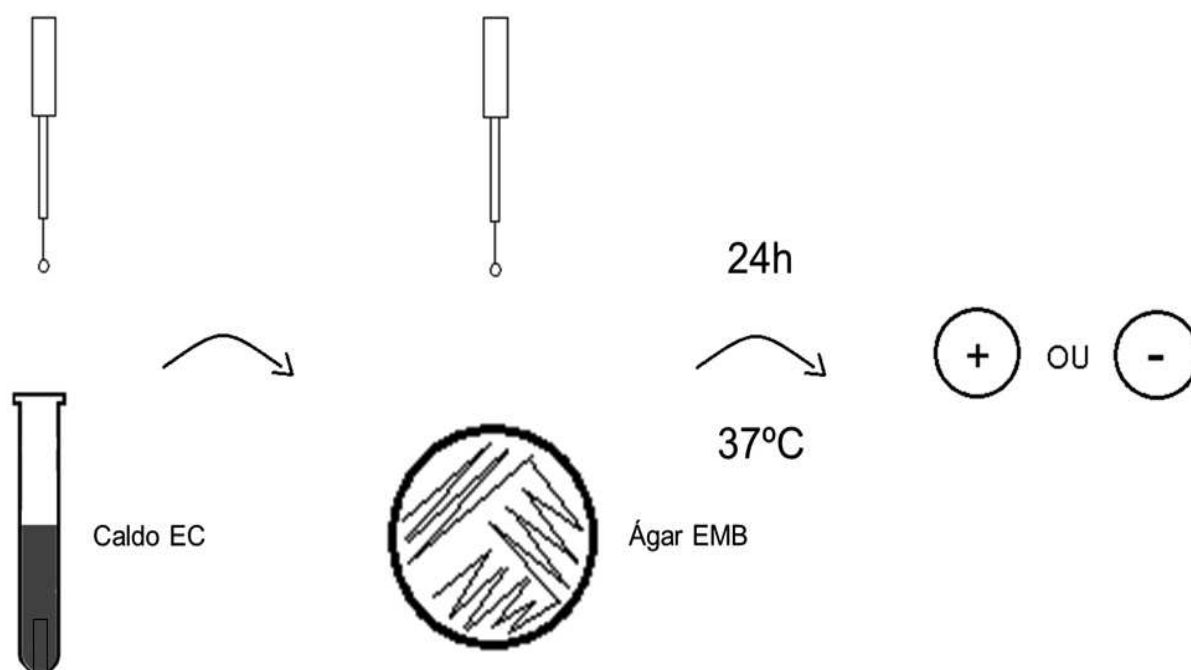


Fonte: Autoria Própria (2018)

3.2.4 Teste de confirmação para *Escherichia coli*

Para a confirmação de presença de *E. coli* (Imagem 5) os tubos positivos do teste para coliformes termotolerantes foram utilizados para a semear uma alçada dessas amostras em placa com ágar Eozina Azul de Metileno (EMB), a incubação foi realizada a 37°C por 24 horas. O resultado foi considerado positivo para colônias com brilho verde metálicas, que foram submetidas a provas bioquímicas: indol, Vermelho de Metila, Vogues Proskauer e citrato para confirmação do microrganismo (SANTOS, 2007).

Imagem 5: Teste de confirmação para *Escherichia coli*

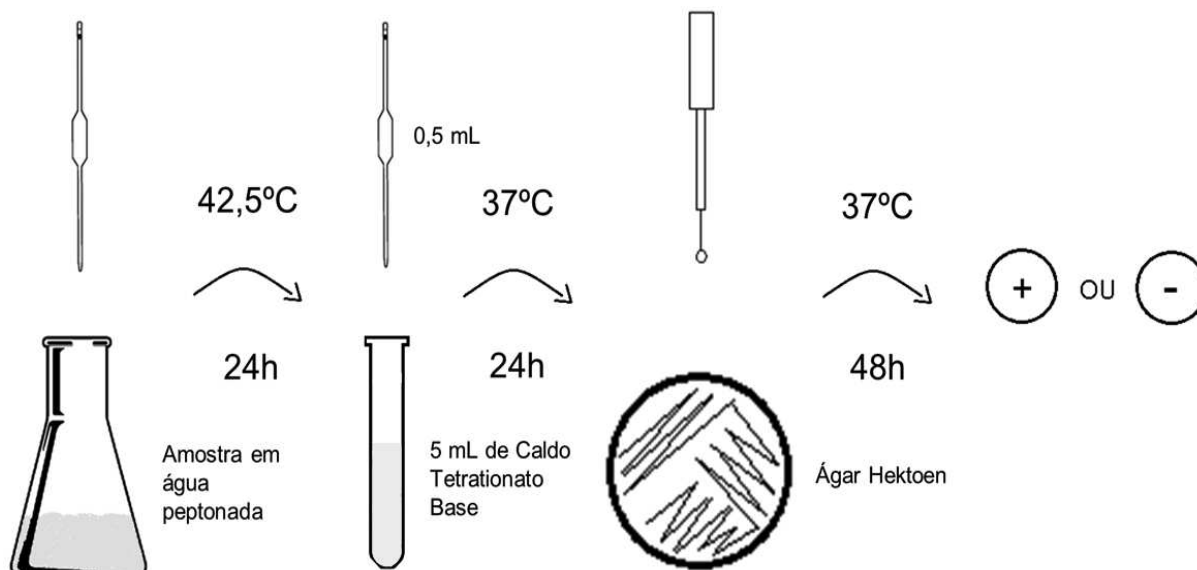


Fonte: Autoria Própria (2018) 1

3.2.5 Teste de confirmação para *Salmonella* spp.

Para o teste, 25g de cada amostra foram diluídas em 225 mL de água peptonada tamponada para a realização das análises e incubado por 24 horas a uma temperatura entre 35 e 37°C. A seguir, em 5 mL de caldo Tetrionato Base suplementado imediatamente antes do uso com solução de iodo foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL de amostra em 10 tubos, para depois incubar em banho de água a 42°C \pm 0,5 por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram estriadas em placas contendo Ágar Hektoen e incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 37°C \pm 0,5°, como mostra a Imagem 6. A realização de identificações bioquímicas como Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e indol para colônias suspeitas de *Salmonella* spp., caracterizadas por coloração verde-azulada com ou sem centro negro, foram efetuadas para a confirmação do microrganismo (SHINOHARA et al., 2014).

Imagem 6: Teste de confirmação para *Salmonella* spp.



Fonte: Autoria Própria (2018)

3.2.6 Testes bioquímicos de identificação de microrganismos

A prova do citrato foi realizada utilizando-se ágar citrato e alça de níquel cromo flambada e fria. Uma alçada do microrganismo foi estriada na superfície do meio e o resultado após 24h de crescimento a 37°C foi verificado.

Uma alçada de bactérias foi inoculada em água peptonada, após incubação por 24h a 35°C em estufa, foi realizada a verificação do crescimento do microrganismo. Em seguida, o reagente de Kovacs foi adicionado ao longo das paredes dos tubos e o resultado identificado.

Em caldo VM-VP uma alçada de microrganismos foi transferida, após crescimento em estufa por 24h a 35°C o Vermelho de Metila foi adicionado em um dos tubos para observação de mudança de cor. Já para outro tubo o reagente de Barrit foi adicionado para observação de mudança de cor.

O teste em ágar TSI foi realizado utilizando-se uma alça de níquel cromo flambada e fria. Uma alçada de microrganismos foi inserida em 3 centímetros dentro do cilindro de ágar em tubo, e outra alçada foi estriada na superfície do ágar. Dentre 18 e 24h o resultado foi visualizado (LÁZARO et al., 2008).

3.3 Teste de sensibilidade ao vinagre

Diluições de porcentagens de 1, 5, 10, 15, 20% (V/V) de vinagre de álcool em água destilada foram preparadas. Além disso, foram padronizados caldos Mueller Hinton com $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de bactérias isoladas e identificadas neste estudo utilizando como padrão a escala 0,5 McFarland.

Em tubos esterilizados foram transferidos 2mL de caldo padronizado e 1mL da solução água e vinagre, obtendo-se as concentrações de 0,33, 1,66, 3,33, 5,00 e 6,66%. Os testes foram realizados em triplicata e após 18h de incubação a $35,5 \pm 1$ °C. Foi observado o crescimento de microrganismos nos tubos com turvação, já os tubos que permaneceram límpidos a inibição pôde ser observada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 2 amostras de água analisadas, a água de irrigação das Hortas 1 e 2 mostraram ter presente uma grande quantidade de coliformes totais e termotolerantes (460 e 23 NMP mL⁻¹), esse valor ultrapassa o máximo permitido que é de 2 NMP mL⁻¹ pela Resolução do CONAMA nº 357/2005 e essa norma não indica um número máximo permitido de coliformes totais presentes na amostra. Por se tratar de água de rio quem contém grande quantidade de matéria orgânica dissolvida e passa por outros locais antes de chegar á propriedade da empresa, uma maior quantidade de microrganismos a ser encontrada em relação à água da Horta 2 já era esperada, pois a água de nascente está em sua forma pura e não passa por nenhuma outra propriedade antes de ser utilizada na irrigação das hortaliças orgânicas. Além disso, em épocas de chuva o aumento do volume do rio carrega uma maior quantidade de matéria orgânica, tanto que a amostra de água da Horta 1, no teste de verificação de *Salmonella* spp. revelou a presença em grande quantidade dessa bactéria na água.

A *Salmonella* spp. é uma bactéria muito perigosa, ela é a causa de muitas infecções gastrintestinais e sua presença confirmada na água de irrigação é muito preocupante, pois a água é um veículo de disseminação de microrganismos. O tratamento da água deve ser realizado antes de sua utilização na irrigação para o controle dessa e outras bactérias presentes na água (BEZERRA, 2015). A utilização dessa água para irrigação pode causar a proliferação desse microrganismo no solo e vegetais.

A Tabela 1 mostra os resultados para coliformes totais, termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. encontrados nas análises das amostras das duas hortas.

Tabela 1: Resultados dos testes confirmativos e para coliformes totais e termotolerantes das duas Hortas

Amostra	Coliformes totais NMP g ⁻¹ ou mL ⁻¹	Valor referência NMP g ⁻¹ ou mL ⁻¹	Coliformes Termotolerantes NMP g ⁻¹ ou mL ⁻¹	Valor referência NMP g ⁻¹ ou mL ⁻¹	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Água H1	460	-	460	2	Negativo	Positivo
Água H2	23	-	23	2	Negativo	Negativo
Alface H1	43	10 ³	< 3,0	10 ²	Negativo	Negativo
Alface H2	>1100	10 ³	210	10 ²	Negativo	Negativo
Couve H1	9,2	10 ³	<3,0	10 ²	Negativo	Negativo
Couve H2	150	10 ³	<3,0	10 ²	Negativo	Negativo
Solo da Alface H1	1100	-	6,1	-	Negativo	Negativo
Solo da Alface H2	460	-	3,6	-	Negativo	Negativo
Solo da Couve H1	28	-	3,6	-	Positivo	Negativo
Solo da Couve H2	>1100	-	43	-	Negativo	Negativo

Fonte: Autoria própria (2018)

Notas:

H1 – Horta 1; H2 – Horta 2.

De acordo com Michereff et al. (2005) e Nunes e Rezende (2015) estima-se que a população bacteriana em solos encontra-se num valor entre 10⁸ e 10⁹ NMP g⁻¹ e esse número varia dependendo do solo e seu manejo. Os resultados revelam que as amostras de solo apresentaram pequenas quantidades de coliformes totais (de 28 até >1100 NMP g⁻¹) se comparados ao número sugerido por Michereff et al. (2005). Porém esse número abrange todas as bactérias existentes, portanto esse número que parece elevado, pode ser baixo.

A produção de hortaliças requer uma grande quantidade de água, temperaturas agradáveis, e grande quantidade de nutrientes no solo. Essa necessidade de um solo bastante fértil ocasiona na utilização de muito adubo e

esses fertilizantes são compostos geralmente de fezes de origem animal rica em microrganismos que podem contaminar as hortaliças.

A RDC nº12 de 2001 indica limites de 10^2 NMP g^{-1} para a presença de coliformes termotolerantes para hortaliças cruas ou “in natura”. E a presença de *Escherichia coli* deve ser confirmada, portanto um teste para os tubos das amostras de água, solo e hortaliças que acusaram a possível presença desse microrganismo foi realizado e apenas um desses testes foi positivo (Solo da Couve da Horta 1).

A presença de *E. coli* na amostra de Solo da Couve indica que as plantas correm o risco de contaminação e por isso, um controle maior delas é necessário, pois o solo é uma das vias de transporte de microrganismos. A água é um meio de transporte dessas bactérias e pode ter ajudado na disseminação desse microrganismo.

Na amostra da alface da Horta 2 foi encontrado números elevados de coliformes totais, o valor foi de >1100 NMP g^{-1} . Segundo Oliveira (2008), o valor máximo aceitável de coliformes totais presente em amostras de hortaliças de consumo cru é de 10^3 NMP g^{-1} e em seu trabalho afirma que cerca de 81,5% das 162 de suas amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas apresentaram população de coliformes totais acima desse limite. Isso indica que a produção não cumpre o conjunto de medidas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) um dos programas mais importantes a ser aplicado para a garantia de um produto final de qualidade. Além disso, esse número elevado de microrganismos pode diminuir o tempo de prateleira do alimento (SMANIOTO et al., 2009).

A quantidade de coliformes termotolerantes encontrada na alface da Horta 2 (210 NMP g^{-1}) se mostrou acima do permitido por legislação. Por se tratar de uma planta herbácea com caule diminuto e folhas muito próximas umas entre as outras ela necessita de muita água, nutrientes e uma temperatura agradável para se desenvolver a alface está susceptível à propagação de microrganismos, também, sua proximidade ao solo adubado com esterco aumenta muito a probabilidade de contaminação por bactérias termotolerantes. Já a couve, é uma planta arbustiva, a grande distância entre suas folhas e o chão dificulta a contaminação por microrganismos presentes no solo.

Em trabalho semelhante, foi encontrado por Saraiva (2013), em 29,35% de suas amostras, coliformes termotolerantes em valores superiores a 10^2 NMP g^{-1} ,

nas amostras de alface, e 5×10^2 NMP g^{-1} , nas de tomate, ou seja, estavam impróprias para consumo humano de acordo com a ANVISA.

Oliveira (2008) afirma que em sua dissertação, coliformes termotolerantes foram detectados em 107 das amostras de hortaliças minimamente processadas. Dessas amostras, 74 apresentaram populações acima de 10^2 NMP g^{-1} .

Já Santos (2007) em um trabalho parecido, afirma que coliformes termotolerantes estavam presentes em 82,1% de suas amostras de hortaliças.

Esse número elevado de microrganismos é preocupante, isso porque as amostras foram obtidas diretamente na horta, ou seja, essas hortaliças ainda devem passar pela lavagem, seleção, embalagem, refrigeração, distribuição e venda, até chegar ao prato do consumidor. Todas essas etapas envolvem manuseio humano, que pode contaminar ainda mais o alimento, portanto a lavagem e seleção são as principais etapas, que devem ser realizadas com muita eficácia, para a obtenção de um alimento de melhor qualidade (OLIVEIRA, 2008; SARAIVA, 2013).

A Tabela 2 apresenta resultados da inibição com vinagre para *E. coli* e *Salmonella* spp., juntamente com a porcentagem de vinagre em água e o pH das soluções. Neste estudo os resultados para as duas bactérias foram os mesmos, ou seja, a porcentagem de 3,33 de vinagre em água inibiu o desenvolvimento desses dois microrganismos.

Tabela 2: Resultados de inibição com vinagre para *E. coli* e *Salmonella* spp.

Porcentagem de vinagre em água (V/V)	pH das soluções	Resultado da inibição
0,33%	3,23	Negativo
1,66%	2,96	Negativo
3,33%	2,77	Positivo
5,00%	2,69	Positivo
6,66%	2,62	Positivo

Fonte: A autoria própria (2018)

Os resultados obtidos são satisfatórios, já que para Utyama (2003) a porcentagem mínima inibitória para *E. coli* foi de 15% de vinagre. Em trabalho

semelhante, Filho (2010) utilizando medidas caseiras (2 colheres de vinagre para 1 litro de água), conclui que o vinagre pode reduzir o crescimento bacteriano dependendo da concentração. Vitorino et al. (2013) obteve resultados bons na inibição de *Salmonella* spp. em couve minimamente processada.

Os microrganismos *E. coli* e *Salmonella* spp. são bactérias Gram-negativas solúveis em álcool, essa característica as tornam vulneráveis já que a parede celular de bactérias Gram-negativas é bem menos espessa do que Gram-positivas, ou seja, a pressão que elas aguentam é menor. Quando em contato com grande quantidade de ácido acético a parede celular das bactérias se rompe e elas ficam desprotegidas, morrendo logo em seguida (UTYAMA et al., 2007).

Para a inibição desses dois patógenos, uma pequena quantidade de vinagre é necessária, a diferença de pH nas diluições 1,66 e 3,33% não foi grande, portanto percebe-se que o pH não foi o fator limitante do crescimento desses microrganismos e sim a quantidade de ácido acético.

Apesar dos resultados obtidos, a utilização do vinagre como antimicrobiano pelos produtores é improvável, pois adicionaria tempo e mão de obra ao processo, além de gastos, o que pode tornar o produto mais caro, ocasionando na perda de clientes para a concorrência. Sendo assim, uma alternativa para o produtor seria a recomendação por escrito na embalagem, para que o próprio consumidor faça a higienização do produto utilizando vinagre antes do consumo, aumentando também o tempo de conservação do vegetal.

5 CONCLUSÃO

A análise microbiológica da água de irrigação, solo e hortaliças advindas de produção orgânica de duas propriedades do Oeste do Paraná foi bem sucedida e a qualidade sanitária foi comparada com padrões microbiológicos vigentes exigidos por lei quando existentes.

A quantidade de coliformes encontrados em algumas amostras aponta o quão importante é a manipulação desses produtos desde a saída da horta até a casa do consumidor.

A partir dos resultados obtidos conclui-se que a elaboração de normas indicando a quantidade máxima permitida de microrganismos específicos em solos é necessária.

Constata-se também que a qualidade microbiológica da hortaliça produzida está diretamente relacionada à água de irrigação e aos solos utilizados na produção, ou seja, o excesso de microrganismos presentes nesses locais pode contaminar o vegetal tornando-o impróprio para o consumo.

No resultado de inibição utilizando-se vinagre se álcool, as concentrações a partir de 3,33% se mostraram eficientes na inibição de crescimento de *E. coli* e *Salmonella* spp., portanto o controle do excesso da microbiota pode ser realizado de forma barata e fácil pela utilização de vinagre de álcool pelo produtor. A recomendação da utilização do vinagre como inibidor de microrganismos patógenos pode ser feita pelos produtores aos consumidores.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.S. **Qualidade da água das fontes de abastecimento e de estabelecimentos de manipulação de alimentos no município de Areal-RJ.** Universidade Federal Fluminense. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Área de Concentração de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Niterói, Rio de Janeiro, 2011.

BACCI, D.L.C.; PATACA, E.M. Educação para a água. Estudos avançados. Volume 22, n. 63, p. 1-16. São Paulo. 2008.

BARTH, M.; HANKINSON, T.; ZHUANG H.; BREIDT, F. Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. **Springer Science Business Media.** P. 1-49. Food Microbiology and Food Safety. LLC, 2009.

BEZERRA, N.S. **Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em hortaliças comercializadas em estabelecimento formal e não formal de João Pessoa – PB.** Originalmente apresentada como Monografia para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba. P. 1-44. João Pessoa, Estado da Paraíba – Brasil. 2015.

BOAS, R.C.V.; MOREIRA, F. M. S. **Microbiologia do solo no ensino médio de Lavras, MG.** Revista Brasileira de Ciência do Solo. Volume 36, n. 1, p. 1-12. Viçosa, 2012.

BUCK, J.W.; WALCOTT, R.R.; BEUCHAT, L.R. Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables. **Peer-Reviewed Journal of Applied Plant Health.** P 1-10. Department of Plant Pathology. University of Georgia, 2003.

CASALAB. **Caldo Mueller Hinton 500 g.** Belo Horizonte, Minas Gerais, 2018.

CANTU, R.R.; HARO, M.M.; MORALES, R.G.F.; VISCONTI, A.; SCHALLENBERGER, E. Qualidade da Água Utilizada na Irrigação de Hortaliças na Região do Litoral Norte de Santa Catarina. **Revista de estudos ambientais**. Volume 17, n. 2, p. 41-50. Itajaí, Santa Catarina, 2015.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005**. Publicada no Diário Oficial da União, n. 053, p. 58-63, 2005.

COSTA, E.A.; FIGUEIREDO, E.A.T.; CHAVES, C.S.; ALMEIDA, P.C.; VASCONCELOS, N.M.; MAGALHÃES I.M.C.; MORAES, A.F.; PAIXÃO L.M.N. **Avaliação Microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa L.*) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização**. Alimentação e Nutrição. Volume 23, n.3, p. 387-392. Araraquara, São Paulo, 2012.

DIAS, M.F.F. **Qualidade microbiológica de águas minerais em garrafas individuais comercializadas em Araraquara-SP**. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, câmpus de Araraquara. P. 1-68. São Paulo, 2008.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Editora Atheneu. 2ª Edição. P. 1-652. São Paulo, 2008.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. **Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, de hidroponia, em função de fontes de nutrientes**. Horticultura Brasileira, Brasília. Volume 20, n. 2, p. 195-200, 2002.

FERREIRA, H.; LIMA, H.; COELHO, T. **Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal**. Universidade Federal Rural do Semiárido. P. 1-10. 2014.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Universidade Federal de Viçosa. 3ª edição, p. 1-421. Viçosa, Minas Gerais, 2013.

FILHO, E.R.M. **Avaliação da ação bactericida do vinagre em *Escherichia coli* e bactérias mesófilas**. Fundação Educacional do Município de Assis. Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis. Campus José Santilli Sobrinho. 2010.

FUNASA, Fundação Nacional da Saúde. **Manual prático de análise de água**. Quarta edição, Funasa, Brasília, 2013.

KOYUNCU, S.; ANDERSSON, M.G.; LÖFSTRÖM, C.; SKANDAMIS, P.N.; GOUNADAKI, A.; ZENTEK, J.; PERHÄGGBLÖM. Organic acids for control of *Salmonella* in different feed materials. **BioMed Central, The Open Access Publisher**. P. 1-10. April 18, 2013.

LÁZARO, N.S.; REIS, E.M.F.; PEREIRA, C.S.; RODRIGUES, D.P. **Gênero *Salmonella*: Características Epidemiológicas e Laboratoriais**. Laboratório de

Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas. Instituto Oswaldo Cruz. 2008.

MAFFEI, D.F.; SILVEIRA, N.F.A.; CATANOZI, M.P.L.M. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. **Elsevier Journal. Science Direct**. Volume 29, n. 1, p. 1-5. Araraquara, São Paulo, 2013.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. P. 61-92. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, 2005.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **“O que são produtos Orgânicos?”**. Publicado dia 18 de novembro de 2016 e modificado dia 11 de março de 2017.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.S. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Universidade Federal de Lavras. 2ª edição atualizada e ampliada, p. 1-744. 2006.

NEOGEN DO BRASIL. **Caldo Lauril Sulfato**. Acumedia Manufacturers Inc., 2010.

NEOGEN DO BRASIL. **Caldo Tetrionato**. Acumedia Manufacturers Inc., 2014.

NEOGEN DO BRASIL. **Caldo Verde Bile Brilhante 2%**. Acumedia Manufacturers Inc., 2010.

NEOGEN DO BRASIL. **Meio EC**. Acumedia Manufacturers Inc., 2015.

NEOGEN DO BRASIL. **Ágar Eozina Azul de Metileno Holt**. Acumedia Manufacturers Inc., 2011.

NEOGEN DO BRASIL. **Ágar Hektoen Entérico**. Acumedia Manufacturers Inc., 2008.

NOVO, M.C.SS.; PRELA-PANTANO, A.; TRANI, P.E.; BLAT, S.F. **Desenvolvimento e produção de genótipos de couve manteiga**. Horticultura Brasileira, v.28, n. 3, p. 1-5. Campinas, São Paulo, 2010.

NUNES, R.R.; RESENDE, M.O.O. **Recurso Solo: propriedades e usos**. 1ª edição, p. 250-272. MATOS, M.L.T. Editora Cubo. Universidade de São Paulo. São Carlos, São Paulo, 2015 .

OLIVEIRA, M.A. **Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes***. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. P. 1-140. 2008.

PÁDUA, H.B. **Informações sobre Coliformes Totais / Fecais e alguns outros organismos indicadores, em sistemas aquáticos.** Caderno de Doutrina Ambiental. 23ª Procuradoria de Justiça Criminal de Goiás. 010401037. 2003.

PAIVA, J.L. **Avaliação microbiológica da alface (*Lactuca sativa*) em sistema de cultivo hidropônico e no solo, correlacionando os microrganismos isolados com os encontrados em toxinfecções alimentares em municípios da região Noroeste de São Paulo – SP.** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto. P. 1-115. São José do Rio Preto, 2011.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: Teoria e Prática. Conceitos básicos de Epidemiologia.** Editora Guanabara Koogan, 598 p. Capítulo 1. P. 1-14. Rio de Janeiro, 1995.

PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. **Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* spp. em queijo Minas.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Volume 51, n. 5, Belo Horizonte, out. 1999.

RDC, nº12. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos.** Resolução-RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

RICHTER, C.A. **Água: Métodos e tecnologia de tratamento.** Edgard Blücher, p.352, São Paulo, 2009.

SANTANA, L.R.R.; CARVALHO, Rosemary D.S.; LEITE, C.C.; ALCÂNTARA, L.M.; OLIVEIRA, T.W.S.; RODRIGUES, B.M. **Qualidade Física, Microbiológica e Parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. Volume 26, n. 2, p. 1-6. Campinas, 2006.

SANTOS, Y.T.O. **Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador - BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli*.** Universidade Federal da Bahia. Escola de nutrição, p. 1-102. Salvador, 2007.

SARAIVA, C.N. **Avaliação microbiológica das principais hortaliças comercializadas nos municípios de Juazeiro do Norte e Crato, no Ceará.** Universidade Federal Rural do Semiárido, p. 1-62. Mossoró, Rio Grande do Norte, 2013.

SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. **Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. Volume 26, n. 2, p. 1-8. Campinas, São Paulo, 2006.

SILVA, I.N.; FONTES, L.O.; TAVELLA, L.B.; OLIVEIRA, J.B.; OLIVEIRA, A.C. **Qualidade de água na Irrigação.** Agropecuária Científica no Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande. Volume 7, n. 03, p. 1-15. Patos, Paraíba, 2011.

SHINGO, G.Y.; VENTURA, M.U. **Produção de couve *Brassica oleracea* var. *acephala* com adubação mineral e orgânica.** Ciências Agrárias. Volume 30, n. 3, p. 589-594, Londrina, Paraná, 2009.

SHINOHARA, N.K.S.; LIMA, T.B.N.; SIQUEIRA, L.P.; PEREIRA, J.A.P.; PADILHA, M.R.F. Avaliação da qualidade microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do Recife, Brasil. **Revista Eletrônica “Diálogos Acadêmicos” (ISSN: 0486-6266).** Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Nossa Senhora Aparecida. 2014.

SMANIOTO, T.F.; PIROLO, N.J.; SIMIONATO, E.M.R.S.; ARRUDA, M.C. Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. P. 150-154. São Paulo, 2009.

UTYAMA, I.K.A.; ANDRADE, D.; WATANABE, E.; PIMENTA, F. C.; ITO, Y.I. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia (ISSN: 1888-8884).** Volume 4, p – 202-207. 2007.

UTYAMA, I.K.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas.** Universidade de São Paulo. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. P. 1-148. Ribeirão Preto, São Paulo, 2003.

VALSECHI, O.A. **Microbiologia dos alimentos.** Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconômica Rural. Araras, São Paulo, 2006.

VIDIGAL, S.M.; RIBEIRO, A.C.; CASALI, V.W.D.; FONTES, L.E.F. Resposta da alface (*Lactuca sativa* L.) ao efeito residual da adubação orgânica. I - Ensaio de Campo. **Revista Ceres.** Volume 42, n. 239, p. 80-88. Viçosa, Minas Gerais, 1995.

VITORINO, L.C.; OLIVEIRA, K.B.; MOURA, L.C.; FURTADO, D.C. **Eficiência de sanitizantes no controle microbiano da couve (*Brassica oleracea*) minimamente processada, em função do tempo de armazenamento.** Instituto Federal Goiano. Curso de Engenharia de Alimentos. Volume 9, n. 16, p. 1-14. Rio Verde, Goiás, 2013.