

Análise da Presença de Bactérias em Bebedouros de uma Instituição de Ensino Superior do Município de Anápolis - Goiás

Analysis of Bacteria Presence in Water Dispensers of a Higher Education Institution of the City of Anápolis - Goiás

Joel Rocha da Silva^a; Erick de Oliveira Lemes^b; Daiana da Silva Vargem^b; Deborah Patrícia de Oliveira^b; Isabella Raissa B. Arcanjo^b; Lara Carolinne E. da Mata^b; Leidiane Macedo Rodrigues^b

^aFaculdade Anhanguera de Anápolis, GO, Brasil

^bFaculdade Anhanguera de Anápolis, Curso de Farmácia, GO, Brasil

*E-mail: jo.rochas@hotmail.com

Resumo

Nas Instituições Educacionais de Ensino, a limpeza e higienização dos equipamentos e ambientes de uso comum são feitas diariamente. Entretanto a regularidade da higiene, não atenua os focos de contaminação. Esta pesquisa teve por objetivo analisar os bebedouros de uma Instituição de Ensino Superior na cidade de Anápolis - Go. A metodologia empregada para realização deste trabalho foi composta por doze bicos de bebedouros e priorizou os que foram encontrados nos blocos dos alunos da área da saúde. Foram utilizados para coleta das amostras doze swab's embebidos em soro fisiológico estéril que foram introduzidos no bocal dos bebedouros e em seguida inoculados em meio de cultura de líquidos BHI. Após essa etapa, as amostras foram plaqueadas nos meios de cultura ágar Manitol, ágar sangue, ágar Muller Hinton e ágar MacConkey, e foi realizada a identificação das bactérias por meio de técnicas de replique em ágar sangue para separar α -hemolítico e β -hemolítico, e foi feito o teste de catalase para a separação de *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e o ágar manitol para a identificação *Staphylococcus aureus* e a Coloração de Gram para identificar as demais bactérias. Após a realização dos testes foram encontrados *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus sp.* e Bacilo Gram-positivo encapsulado. Conclui-se que esses achados têm uma grande importância na identificação de intoxicações causadas pela má higienização de alimentos, utensílios e bebedouros e na contaminação dos usuários.

Palavras-chave: Bactérias. Métodos. *Staphylococcus aureus*.

Abstract

*In Education Institutions, the cleanliness and hygiene of the common use of equipment and environments are made daily. However, the regularity of hygiene does not mitigate the sources of contamination. This research aimed to analyze the water dispensers of a higher education institution in the city of Anápolis - Go. The methodology used for this work was composed by twelve nozzles water dispensers, prioritized those found in the blocks of students of the health area. Were used for collection twelve samples swab's soaked in sterile saline, which were introduced into the nozzle water dispensers and then inoculated into a BHI liquid culture. After this step the samples were plated in Mannitol agar culture, blood agar, Muller Hinton agar and MacConkey and identification of bacteria was done by means of technique to replicate in blood agar to separate α -hemolytic and β -hemolytic, and it was done the catalase test for separation of *Staphylococcus* and *Streptococcus*, mannitol agar and for identifying *Staphylococcus aureus* and Gram staining to identify other bacteria. After performing the test *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus sp* were found and bacillus and Gram-positive encapsulated. We concluded that these findings are of great importance in identifying poisoning caused by poor hygiene of food, utensils and water dispenser and contamination of users.*

Keywords: *Bacteria. Methods. Staphylococcus aureus.*

1 Introdução

Bactérias são seres microscópicos, procariotos, que se reproduzem principalmente por divisão binária, e podem ser patogênicos ou não. Uma forma de diferenciá-las é pelo método de Coloração de Gram, técnica que utiliza corante cristal violeta (cor azul a púrpura) e corante safranina (cor rosa a vermelha). A Coloração de Gram separa as bactérias em dois grandes grupos, as Gram-positivas que possuem camada espessa de peptidoglicano, que lhe confere a cor azul à púrpura e Gram-negativa que se coram de rosa a vermelho, por ter uma fina camada de peptidoglicano, que facilita a remoção do primeiro corante (BURTON; ENGEIKIRK, 2005).

Nas Instituições Educacionais de Ensino, a limpeza e higienização dos equipamentos e ambientes de uso comum são feitas diariamente. Entretanto a regularidade da

higiene não atenua os focos de contaminação por bactérias (HARVEY, 2008).

A presença de bactérias pode ocasionar alguns prejuízos à saúde humana. As bactérias consideradas patogênicas são capazes de causar dores de garganta, pneumonias, gastroenterites bacterianas, doenças de pele, meningites, entre outras (TOTORA; FUNKE; CASE).

Doenças causadas por bactérias podem ser disseminadas pelo uso inadequado de objetos de meio comum. A higienização imprópria, a falta da lavagem adequada das mãos, faz do bebedouro um objeto público de dispersão de bactérias. Isso é justificado pelo desconhecimento dos hábitos de higiene das pessoas que o utilizam (HARVEY, 2008).

As mãos são um dos maiores vetores de contaminação de materiais, objetos e pessoas. É preciso que seja realizado uma

assepsia adequada das mãos após o uso de banheiros, evitando assim a transmissão de bactérias pelo ambiente (SANTOS, 2003; BRASIL, 1998). A localização dos bebedouros é outro agravante que interfere para sua contaminação. Segundo a Portaria nº 456/95 – SES/GO, de 10 de junho de 1995, no Artigo 53, parágrafo único, veta a acomodação de bebedouros nas instalações sanitárias, mas não impede que eles estejam perto dos sanitários (GOIAS, 1995). No presente estudo, foi observado, todavia, que os bebedouros em análise se localizam muito próximos das dependências sanitárias.

Os dados acima motivaram os estudos de qualificação de microrganismos presentes nos bebedouros, uma vez que esses objetos podem funcionar como vetores e transmitir diversas moléstias, gerando agravo à saúde pública. O presente trabalho teve como objetivo analisar a presença de bactérias em bebedouros de uma Instituição de Ensino Superior do município de Anápolis - Goiás.

2 Material e Métodos

O trabalho em questão tratou de uma pesquisa de campo com abordagem qualitativa. Foram coletadas amostras nos bicos de doze bebedouros usados para o consumo humano de água de uma Instituição de Ensino Superior de grande porte, com média de 12.000 alunos, na cidade de Anápolis - GO, com o objetivo de investigar a presença de contaminação por microrganismos nesses bebedouros.

Foi realizada uma amostragem consensual, pois priorizou-se os bebedouros encontrados nos blocos dos alunos da área da saúde e aqueles blocos onde havia intenso fluxo de pessoas, os quais trazem grandes riscos de contaminação para a comunidade acadêmica. A coleta e análise das amostras foram realizadas no período de 30 dias. As coletas das amostras ocorreram de forma aleatória, porém todas no mesmo dia e antes de ser realizada a higienização dos bebedouros.

As vidrarias foram devidamente esterilizadas de acordo com o protocolo do laboratório da Faculdade Anhanguera de Anápolis (2010), e foram preparados os seguintes meios de cultura: ágar Manitol (Synth) ágar sangue (Synth), ágar Muller Hinton (Difco), ágar MacConkey (Synth) e BHI (Difco). Os meios de cultura foram hidratados e autoclavados. Após seu resfriamento foram distribuídos em seis placas de Petri (cada meio de cultura), com exceção do BHI que foi conservado em tubo de ensaio, e conservados em geladeira por 24 horas; para a realização do controle de qualidade das placas preparadas foram seguidas as especificações do Procedimento Operacional Padrão do laboratório.

Para a coleta das amostras foram utilizados doze swab's que, embebidos em soro fisiológico estéril, foram introduzidos apenas no bocal dos bebedouros e em seguida inoculados em meio de cultura BHI. Os inócuos permaneceram na estufa a 37 °C por 24 horas para crescimento.

Após o período de crescimento foram observadas turvações em todos os doze tubos com BHI (Figura 1). Essas amostras foram plaqueadas nos meios de cultura manitol,

sangue e MacConkey e foram levados para a estufa a 37 °C por 24 horas.

Figura 1: Tubos com BHI, presença de turvação



Fonte: Os autores.

Após as 24 horas, foi evidenciado o crescimento de colônias nos meios de ágar sangue e manitol, no meio de cultura ágar MacConkey não foi observado nenhum crescimento. De acordo com Oplustil (2010), a identificação das colônias deve se iniciar na percepção das características morfológicas das colônias nos meios de cultura, apresentação das bordas ou formas, elevação, cor, consistência e aparência da superfície da colônia. Devem ser observadas também as reações que ocorrem em determinados meios, como a hemólise em ágar sangue, fermentação no ágar manitol (mudança de cor roxa para amarelo), entre outros testes.

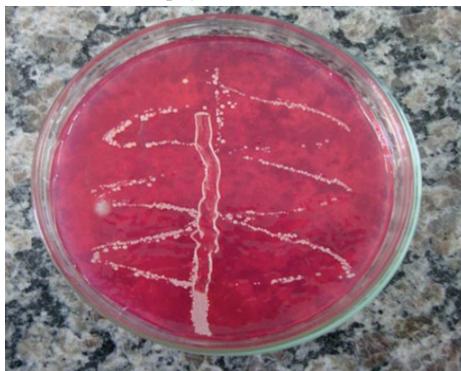
Após a identificação das colônias, as bactérias crescidas em ágar sangue (Figura 2), foram separadas em α -hemolítica e β -hemolítica. Foi realizado o teste de catalase, que é quando o organismo é exposto em uma solução contendo peróxido de oxigênio, que identifica como catalase positiva as que apresentam rápida produção de bolhas, de acordo com Harvey², esse teste serve para separar as bactérias em *Staphylococcus*, *Enterococcus* e em *Streptococcus*. Os esfregaços que sofreram catalase positiva foram semeados em ágar manitol para confirmação de *Staphylococcus aureus*, que fermentam o manitol (Figura 3).

Figura 2: Placa de ágar sangue com crescimento de bactéria α -hemolítica



Fonte: Os autores.

Figura 3: Placa de ágar manitol com crescimento de colônia de *Staphylococcus aureus*



Fonte: Os autores.

As bactérias foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*. Para a confirmação dos resultados foi realizado um teste com o antibiótico novobiocina, sendo ele sensível para *S. aureus* e resistente para *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*.

Esse método utiliza-se apenas de um antibiótico; o protocolo consiste em replicar uma colônia em um meio contendo ágar Mueller-Hinton (Difco), no qual, em seguida, foi aplicado um disco difuso que é um papel filtro impregnado com concentrações estabelecidas de antibiótico. A novobiocina foi a mais indicada. A placa é então encubada em estufa a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, deve-se observar o crescimento de um halo em volta do disco. Quanto maior o halo, mais sensível é a bactéria ao agente microbiano (OPLUSTIL, 2010).

Uma bactéria em especial é evidenciada por não apresentar crescimento em ágar manitol. Esta não apresentou modificação no antibiograma, mostrando-se resistente ao agente microbiano e podendo ser caracterizada por catalase positiva.

Realizou-se na presente bactéria o teste de coloração de Gram, que consiste na realização de um esfregaço de uma pequena parcela da amostra em lâmina de vidro, seguido da adição, após sua secagem, de solução de cristal violeta (deixada em ação por 1 minuto), lugol (deixado em ação com 1 minuto), álcool-acetona (usado rapidamente para descoro), fucsina diluída 1:10 (tempo de contato: 30 segundos) e lavagem com água destilada após cada adição de solução. Após a realização de todo o procedimento a lâmina foi seca ao ar e examinada em microscópio óptico microbiano (OPLUSTIL, 2010). A análise revelou um Bacilo Gram-positivo encapsulado.

3 Resultados e Discussão

Após testes realizados, foram encontrados bactérias gram-positivas, da família *Micrococcaceae*, gênero *Staphylococcus*, e da Família *Streptococcaceae*, gênero *Enterococcus sp.* e um Bacilo Gram-positivo encapsulado.

O Quadro 1 mostra os resultados dos testes realizados e a confirmação do achado.

Quadro 1: Testes realizados para identificação de *Staphylococcus aureus*

Novobiocina	Sensível	Resistente	Resistente
Fermentação (ágar manitol)	Positivo	Positivo/negativo	Negativo
Hemólise	β	α	γ

Fonte: Dados da pesquisa.

A água é um elemento indispensável para o ser humano. Porém, se for de má qualidade ela pode oferecer riscos à saúde, podendo carrear microrganismos causadores de doenças. Por esse motivo o homem deve se atentar aos fatores que interferem diretamente e indiretamente na qualidade dela (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2007; BARCELOS *et al.*, 1998; MOZA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 2006).

Além da fonte que pode estar poluída, existem outros fatores que podem interferir no resultado final da água para consumo, como os reservatórios e sistemas de distribuição se estes não estiverem em condições adequadas (MICELINA *et al.*, 2006).

Os bebedouros são um exemplo de sistema de distribuição utilizado em casos de água para o consumo. Esse aparelho é comum em lugares como hospitais, locais públicos e instituições de ensino, sendo assim, deve-se atentar ao fato de que as pessoas que usufruem desse recurso possuem hábitos desconhecidos e podem ser fonte de contaminação indireta pelo contato com o aparelho (ARAÚJO; BARAÚNA; MENEZES, 2009).

Segundo a portaria nº 456/95 - SES/GO, de 10 de junho de 1995, no Artigo 53, parágrafo único bebedouros não devem ser acomodados em instalações sanitárias e este foi um fator relevante na análise final. Na instituição pesquisada, os bebedouros não estão instalados em um mesmo local, porém estavam bem próximos, em alguns casos ao lado da porta de saída dos sanitários, o que leva a questionar os hábitos de higiene dos mais de 12.000 usuários locais (GOIAS, 1995).

De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, superfícies e equipamentos contaminados podem também ser a causa de infecções (CVE/SES-SP, 2003).

As amostras recolhidas dos bebedouros da Instituição de Ensino Superior foram semeadas em ágar sangue, após o tempo de incubação foi observado crescimento em todas as placas.

As colônias foram diferenciadas de acordo com a morfologia e características, foram separadas em alfa hemólise e beta-hemólise.

Foi realizado um esfregaço de cada colônia crescida, esse esfregaço serviu para a realização do teste de catalase. Os esfregaços catalase positivo (presença de bolhas) representam o gênero *Staphylococcus*.

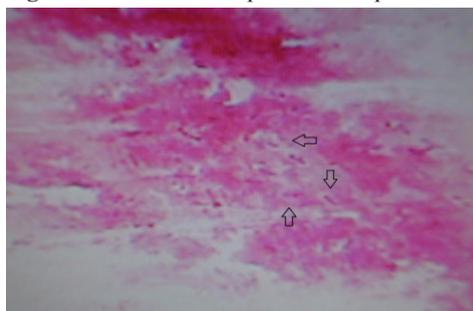
Para a confirmação de que as catalases positivas eram *Staphylococcus*, foram replicadas em ágar manitol. As que fermentaram manitol (mudança na coloração) foram

confirmadas como *Staphylococcus aureus*. Para as que não fermentaram manitol, foi realizado o teste com o antibiótico novobiocina, no qual o *Staphylococcus aureus* é sensível.

Por meio do teste com o antibiótico foram evidenciadas mais três bactérias: *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus sp*, e Bacilo Gram-positivo encapsulado, sendo o último sem ação antibiótica.

Foi evidenciada uma bactéria que não se enquadra na confirmação do achado. Seus testes foram confirmados com coloração de Gram, mostrando a presença de bactéria Bacilo Gram-positivos encapsulados (Figuras 3 e 4). Essa bactéria mostra uma variabilidade genética, presença de cápsula, o que a torna extremamente resistente a antibióticos, maior resistência à adversidade ambiental e adaptação ao meio.

Figura 4: Bacilos Gram-positivo encapsulados



Fonte: Os autores.

A remoção das sujeiras ou sujidades, ajuda no combate da contaminação por microrganismos no ambiente. A limpeza é um importante fator de controle de crescimento microbiano. Sem essas sujeiras, os supostos nutrientes para proliferação do microrganismo serão removidos, assim como o próprio microrganismo. Essa limpeza pode ser feita de forma mecânica (equipamentos) ou pela fricção mecânica com água (COELHO *et al.*, 2006).

Em locais como esse é comum às equipes revezarem os trabalhos e que cada uma fique responsável por um pavilhão ou andar por dia. Com tantos locais diferentes para limpar, é compreensível que alguns fatos importantes passem despercebidos como o uso de uma luva por dia, ou seja, a fim de ganhar tempo e economizar, a mesma luva utilizada para lavar os sanitários no começo do dia, provavelmente será usada para higienizar os bebedouros ao longo do dia.

Esse é um caso de contaminação cruzada, que consiste em transferir microrganismos de um local para outro, seja por meio de utensílios seja pelas próprias mãos (ANVISA, 2009).

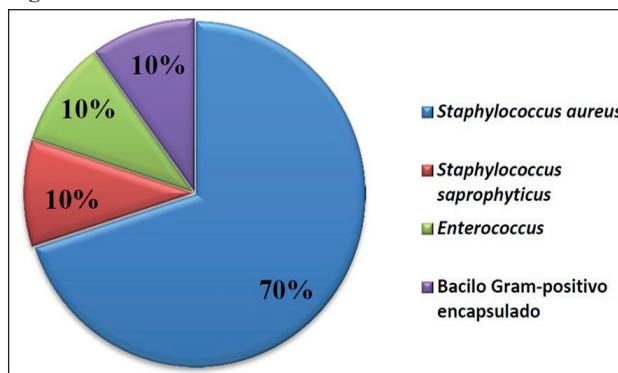
Essa possivelmente é mais uma das causas que levaram à presença de microrganismos nos bebedouros analisados. Segundo Santos (2003), a higienização das mãos é de suma importância no controle de infecções, o que leva a acreditar que a falta de higienização poderia ter ocasionado a infecção do local, já que é comum recorrer a bebedouros após as refeições.

Destaca Santos⁴ que hoje há inúmeras publicações e estudos que demonstram a relação entre a higienização das mãos e a redução na transmissão de infecções. Sendo que a maioria mostra que esse meio é o mais eficaz para prevenir a transmissão desses microrganismos.

Uma das publicações que servem para exemplificar seria da Anvisa, que em 2007 publicou um estudo no qual relata que a rotina de higienização das mãos ainda é insuficiente, tratando-se de profissionais da saúde. Em seu site oficial a agência disponibiliza informações e procedimentos sobre a lavagem das mãos. Essas publicações proporcionam aos profissionais um conhecimento técnico em relação à lavagem das mãos e sua importância, trazendo mais segurança não só aos profissionais, mas também aos pacientes.

Na Figura 5 pode-se observar a quantidade e os tipos de bactérias encontradas nos bocais dos bebedouros.

Figura 5: Bactérias encontradas nos bebedouros



Fonte: Dados da pesquisa.

A presença de *Enterococcus* em alimentos indica condições sanitárias inadequadas, esse microrganismo determina o aparecimento de aminas biogênicas, inclusive as histaminas, o que pode ocasionar intoxicação alimentar a quem consumi-la (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As intoxicações alimentares são doenças microbiológicas causadas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados por microrganismos patogênicos ou suas toxinas. Os casos mais comuns de intoxicação alimentar se dão por ingestão de endotoxinas estafilocócicas termoestáveis (TORTORA; FUNKE, CASE, 2005).

Os sintomas mais comuns nessas intoxicações são febre, vômitos, náuseas dores de estômago, diarreia. Esses sintomas podem ser brandos ou não, dependendo da quantidade de toxinas ou patógenos ingeridos (FORSYTHE, 2002).

No caso das *Staphylococcus sp* a intoxicação se dá pela ingestão de várias toxinas, produto da multiplicação da bactéria nos alimentos deixados em condições inadequadas (SOARES; BERNARDES; NETTO, 2002).

Um dos principais reservatórios de *Staphylococcus aureus* é o ser humano. A bactéria encontra-se na cavidade nasal e pode ser transferido desse local para feridas, ar solo,

água, ou qualquer objeto que tenha entrado em contato com o homem (FRANCO; LANDGRAF, 2008; LACAZ-RUIZ, 2008).

4 Conclusão

Assuntos como a prática da lavagem das mãos devem ser discutidos em instituições de ensino como essa, que tem em sua maioria estudantes da área da saúde. É necessário que os profissionais saiam do curso tendo conhecimento da importância de práticas simples, mas que previnem uma série de problemas como, por exemplo, infecções hospitalares e intoxicações alimentares.

Foram encontradas bactérias da microbiota comum da pele humana, sendo estes o *Staphylococcus aureus*, o *Staphylococcus saprophyticus*. Foram também evidenciadas bactérias que normalmente são encontradas em ambientes contaminados com fezes humanas, o *Enterococcus sp.*

Os resultados encontrados fundamentam ações de controle de qualidade da água, bem como seus reservatórios e sistemas de distribuição, utensílios de manuseio e a higienização de manipuladores e consumidores.

Referências

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa alerta para perigo de contaminação cruzada em alimentos, 2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/151009_1.htm. Acesso em: 24 ago. 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das mãos. 2009. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca_paciente_servicos_saude_higienizacao_maos.pdf. Acesso em: 24 ago. 2015.

ARAÚJO, T.M.; BARAÚNA, A.C.; MENEZES, C.A.R. Identificação de *Escherichia coli* em água de bebedouros e nos próprios aparelhos de quatro escolas públicas de Boa Vista Roraima Brasil. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 4., Belém, 2009. *Anais...* Belém, 2009

BARCELOS, C. et al. Inter-relacionamento de dados ambientais e de saúde: análise de risco à saúde aplicada ao abastecimento de água no Rio de Janeiro utilizando sistemas de informações geográficas. *Cad Saúde Pública*, v.14, n.3, p.597-605, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.616, de 12 de maio de 1998 do Ministério da Saúde (D.O.U. 13/05/98). Instituiu a implantação de Comissões de Controle de Infecções Hospitalares. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616_98.htm. Acesso em: 26 ago. 2015.

BURTON, G.R.W.; ENGEIKIRK, P.G.M. *Microbiologia para ciências da saúde*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. *Moléculas importantes para a compreensão da célula e do seu funcionamento. A célula*. São Paulo: Manole, 2007.

COELHO, R.R.R. et al. *Práticas de microbiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CVE/SES-SP. Centro de vigilância epidemiológica de São Paulo. Manual das doenças transmitidas por alimentos e água. 2003. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Staphylo.htm>. Acesso em: 24 ago. 2015.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008.

GOIAS. Sistema Único de Saúde do Estado de Goiás. Portaria n. 456/95, de 10 de junho de 1995. Norma técnica relativa ao saneamento e ao meio ambiente. Disponível em: http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_431_ntsaneamento.pdf. Acesso em: 24 ago. 2015.

HARVEY, R.A. *Microbiologia ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LACAZ-RUIZ, R. *Manual prático de microbiologia básica*. São Paulo: USP, 2008.

MICHELINA, A.F. et al. Qualidade microbiológica de águas de sistemas de abastecimento público da região de Araçatuba, SP. *Rev. Hig. Aliment.*, v.20, n.147, p.90-95, 2006.

MOZA, P.G. et al. Fatores sociodemográficos e comportamentais relacionados à esquistossomose em uma agrovila da zona canavieira de Pernambuco. *Cad. Saúde Pública*, v.14, n.1, p.107-115, 1998.

OPLUSTIL, C.P. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. São Paulo: Sarvier, 2010.

ROCHA, C.M.B.M. et al. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 1999- 2000. *Cad. Saúde Pública*. V.22, n.9, p.1967-1978, 2006.

SANTOS, A.A.M. *Higienização das mãos no controle das infecções em serviços de saúde*. 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/higienizacao_mao.pdf. Acesso em: 20 ago. 2015.

SOARES, S.R.A.; BERNARDES, R.S. NETTO, O.M.C. Relações entre saneamento, saúde pública e meio ambiente: elementos para formulação de um modelo de planejamento em saneamento. *Cad. Saúde Pública*, v.18, n.6, p.1713-1724, 2002.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed; 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. São Paulo: Artmed, 2010.