

## **NMP DE *Listeria* sp. EM AFLUENTES E EFLUENTES DE MATADOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS EM GOIÁS\***

*César Augusto Garcia\*\**

### **RESUMO**

140 amostras de afluentes e efluentes de matadouros frigoríficos da cidade de Goiânia-GO foram analisados com vistas a avaliar o grau de eficiência dos sistemas de tratamento de efluentes, tomando como referência o microrganismo *Listeria* sp., além de se quantificar este microrganismo. Através da técnica de NMP (Número Mais Provável) concluiu-se que as indústrias já captavam água contaminada por *Listeria* sp. e que o sistema de tratamento de efluentes utilizado não demonstrou eficiência com relação a este microrganismo.

### **INTRODUÇÃO**

Dentre os veículos de transmissão das bactérias do gênero *Listeria*, a literatura cita as águas servidas de matadouros frigoríficos como um do mais importantes. As indústrias de produtos de origem animal têm que se preocupar em tratar seus efluentes, sob pena de, caso não os trate, terem que se responsabilizar por eventuais surtos de zoonoses que podem ser transmitidas por meio destes efluentes.

O presente trabalho objetiva quantificar bactérias do gênero *Listeria* em amostras de afluentes e efluentes produzidos por indústrias com e sem sistema de tratamento de efluentes. Neste trabalho é abordado o risco que representa para a população em geral o despejo de efluentes de matadouros e frigoríficos

---

\* Entregue para publicação em outubro de 1993.

\*\* Docente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, CP 131, CEP 74001-970, Goiânia-GO.

nos cursos fluviais urbanos, dos quais se serve uma parcela significativa da população, sem que os mesmos tenham sofrido qualquer tipo de tratamento com vistas à eliminação de microrganismos patógenos e agentes de zoonoses. BOHM (1989), abordando o aspecto da necessidade de desinfecção de efluentes de matadouros, frisa que, apesar de o efluente sofrer prévio clareamento mecânico antes de ser adicionado ao curso de água natural, isto somente remove partículas relativamente grandes, enquanto os microrganismos permanecem na fase líquida. O fato de uma grande quantidade de conteúdo estomacal (média de 13,59 kg/bovino de 500kg) estar presente nos efluentes de frigoríficos e de os microrganismos contidos nos despejos não serem removidos por purificação preliminar é de particular importância para a epidemiologia da *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* sp., *Bacillus anthracis*, *Brucella* sp. e *Campylobacter* sp. Além destes microrganismos, o autor cita ainda a *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus* sp., os quais são freqüentemente isolados de efluentes de matadouros e são patogênicos para o homem. A inativação desses agentes de doenças, via desinfecção de efluentes, é uma necessidade da qual não podem se esquivar os industriais do ramo de alimentos de origem animal.

É extensa a relação de microrganismos patógenos que podem ser encontrados em águas residuais de matadouros e que são capazes de transmissão pela rota fecal-oral. HAAS (1986) cita entre as bactérias os gêneros *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e o *Vibrio cholerae*. Dentre as viroses, a poliomielite e a hepatite infecciosa são passíveis de transmissão via água. Vários países têm incentivado a reutilização de águas servidas, adequadamente tratadas, para irrigação e outros propósitos não potáveis. Dentre os vários usos de efluentes tratados na irrigação, CROOK (1985) destaca a irrigação de plantas forrageiras fibrosas e de paisagens, tais como campos de golfe e parques, pomares, parreiras e irrigação de sementes para alimentos. Com base nestas informações, pode-se avaliar o risco que se corre quando reutilizam-se águas servidas inadequadamente tratadas ou sem qualquer tipo de tratamento, com finalidade de irrigação de hortaliças, frutas ou quaisquer outros tipos de alimentos.

WATKINS & SNEATH (1981) examinaram amostras de águas de rios e esgotos, utilizando uma técnica que combinava enriquecimento a frio com um enriquecimento em um caldo contendo, dentre outras substâncias, o ácido nalidíxico e o tiocianato de potássio, além de plaqueamento em um meio ágar

triptose. Com esta técnica, os autores isolaram *L. monocytogenes* de todas as amostras de águas analisadas, além de enumerá-las através de uma técnica de Número Mais Provável (NMP).

FENLON (1986) utilizou a técnica de NMP para enumerar *L. monocytogenes* em silagens implicadas em um surto de listerose em bovinos. As amostras eram diluídas em uma série de tubos contendo caldo de enriquecimento e incubadas e estriadas em placas com meio seletivo. Tabelas de NMP foram usadas para calcular a quantidade de *L. monocytogenes* por grama ou mililitro de amostra.

BUCHANAN *et al.* (1988) compararam a eficiência de alguns meios e utilizaram a técnica do NMP em três tubos com meio UVM. Segundo autores, o MVJ tendeu a dar valores mais altos devido ao crescimento de enterococos e *Staphylococcus*.

HOFER (1975) observou a ocorrência de *L. monocytogenes* em 20 amostras de esgotos urbanos na cidade do Rio de Janeiro, em duas oportunidades verificou a presença do patógeno.

De acordo com KAMPELMCHER & JANSEN (1980), em 165 amostras de efluentes examinadas, 100 amostras (61%) foram positivas para *Listeria monocytogenes*, sendo 31 sorotipo 1, 17 do sorotipo 4b e 52 não tipificadas sorologicamente.

DIJKSTRA (1982) estudou a ocorrência de *L. monocytogenes* em águas de superfícies de canais e lagos, fossos e efluentes de uma estação de tratamento de esgotos. Das 33 amostras de efluentes de uma estação de tratamento de esgotos, 22 delas (67%) foram positivas para *Listeria monocytogenes*.

GENEVICH *et al.* (1985) isolaram *L. monocytogenes* em todas as amostras analisadas de efluentes, lama de esgotos e águas de rios. Segundo os autores, as altas contagens obtidas em amostras de lama de esgotos dá uma idéia do risco de se utilizar este material como fertilizante agrícola. Os efluentes e lama de esgotos contribuem para o crescente aumento do microrganismo na natureza.

KAMPELMACHER & JANSEN (1980) relataram a ocorrência de *L. monocytogenes* em águas de efluentes e de superfícies, de 1958 a 1977, nos Países Baixos. Das 165 amostras de efluentes examinadas, 100 amostras foram positivas, sendo 31 do tipo 1, 17 do tipo 4b, 24 hemolíticas não tipáveis e 28 não hemolíticas não tipáveis.

AL-GHAZALI & AL-AZAWI (1986) pesquisaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras de esgotos e lama de esgotos, em todas as etapas, dentro de uma estação de tratamento de esgotos, na cidade de Bagdá, capital do Iraque. Os autores utilizaram também a técnica de NMP para quantificar o microrganismo. A bactéria foi isolada em todas as amostras de esgotos nos diferentes estágios de tratamento, sendo que o maior número (1100 UFC/mililitro ou grama) foi obtido em amostras de esgotos que entravam na estação de tratamento e os menores foram encontrados em torrões de lama de esgoto tratada (menos de 3 UFC/100 gramas). A lama de esgoto tratada demonstrou um grande decréscimo na quantidade do microrganismo em comparação com a lama de esgoto sem tratamento.

SCHONBERG (1988), abordando os aspectos de controle e prevenção da listeriose, diz que a natureza parcialmente telúrica da *Listeria monocytogenes* parece indicar que sua total erradicação do ambiente é totalmente impossível. Todas as substâncias cruas de origem animal podem ser razoavelmente suspeitas de estar contaminadas com o agente, assim como alguns produtos crus de origem não animal, em virtude das técnicas com as quais eles estejam sendo produzidos. O autor afirma ainda que a principal via de transmissão para animais é o consumo de silagens pobres em gramíneas, de inferior qualidade e com pH bastante alto. Por outro lado, animais clinicamente sadios, que eliminam o patógeno em suas fezes, podem contaminar os alimentos durante os processos de abate ou ordenha. Segundo o autor, os alimentos de origem animal são fontes muito importantes de listeriose para o homem e, embora seja conhecida a capacidade da *Listeria* sp. de causar doenças em aves e mamíferos, não existem ou existem muito poucas evidências da transmissão pelo consumo de carne. A falta de evidências diretas pode, entretanto, não refletir a real situação, pois existem fortes evidências indiretas de que a carne e seus produtos têm papel importante na complicada epidemiologia da listeriose humana, já que a *Listeria* sp. têm sido encontrada em animais de abate, tanto nos sadios como naqueles que mostram sinais clínicos da doença, inclusive entre os animais domésticos. Skovgaard (1986), citado por SCHONBERG (1988), afirma que acima de 5% de trabalhadores de matadouros eram portadores de *Listeria* sp.

## MATÉRIAL E MÉTODOS

Foi analisada microbiologicamente a presença de *Listeria* sp. em 140 amostras de água oriundas de afluentes e efluentes de dois matadouros

frigoríficos de bovinos, localizados no município de Goiânia, Estado de Goiás. A indústria 1 possui um padrão de qualidade que a capacita para o comércio nacional e internacional, além de um sistema de tratamento de efluentes composto por tratamento prévio (gradação e desaeração), tratamento primário (decantação e separação de gorduras) e tratamento secundário (lagoas anaeróbias e facultativas). A indústria 2 só realiza comércio local de carnes resfriadas e não possui qualquer tipo de tratamento para seus efluentes.

As amostras foram colhidas em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 1000 mililitros, previamente esterilizados, lacrados e transportados até o laboratório em caixas isotérmicas contendo sacos plásticos com gelo em seu interior. Foram colhidas 70 amostras em cada indústria, sendo 35 no local de captação da água (afluente) e 35 no local onde a indústria vertia suas águas servidas (efluente).

Na quantificação das bactérias do gênero *Listeria* utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). Empregaram-se 3 séries de 3 tubos, sendo que cada série correspondeu a uma diluição. A partir do filtrado obtido da filtração prévia com papel de filtro, alíquotas de 10 mililitros, 1,0 mililitro e 0,1 mililitro das amostras foram semeadas em tubos contendo 15 mililitros de caldo LEB I (LISTERIA ENRICHMENT BROTH -McCLAIN & LEE, 1988), preliminarmente adicionados de 0,07 mililitros de solução de acriflavina a 0,27% em cada um. Após a semeadura, os tubos foram incubados a 30°C por 48 horas. Decorrido o tempo da incubação, fez-se a leitura dos tubos, anotando-se em cada série a quantidade de tubos que demonstraram turvação.

A seguir, repetiu-se o mesmo procedimento com 3 séries de 3 tubos contendo meio LEB II, o qual diferencia-se do LEB I por sofrer adição prévia de 0,15 mililitros de solução acriflavina a 0,25% e 0,15 mililitros de solução de citrato férrico amoniacal a 58%, em cada tubo. A partir dos tubos contendo meio LEB I, retirou-se 0,1 mililitro por tubo e adicionou-se a cada tubo de LEB II, nas respectivas diluições e séries. Incubaram-se os tubos de LEB II por 48 horas a 30°C. Após incubação, observou-se e anotou-se a quantidade de tubos positivos, ou seja, que apresentaram turvação e coloração negra, em cada série. A partir deste ponto, pescaram-se com alça esterilizada alíquotas dos tubos positivos, e semeou-se em placas com meio LSAB (LISTERIA SELECTIVE AGAR BASE - CURTIS *et al.*, 1989), que foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após 48 horas, as colônias esculina positivas (negras) foram pescadas e repicadas em placas com meio TSA (TRYPTICASE SOY AGAR) e incubadas a 30°C por 24 horas.

Desta etapa em diante, a técnica seguiu as mesmas orientações descritas no método FSIS/USDA (McCLAIN & LEE, 1988). Após os resultados das análises sorológicas, observou-se quais dos tubos anotados eram realmente positivos para *Listeria* sp. e recorreu-se à tabela de NMP para quantificação dos microrganismos, segundo as diluições utilizadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação demonstrou uma quantidade mínima de 9 NMP de *Listeria* sp. por mililitro de água e uma quantidade máxima de 95 para os afluentes da indústria 1. Os efluentes desta mesma indústria demonstraram uma quantidade mínima de 6 e uma quantidade máxima >1100. Analisando estes números pelo Teste de Wilcoxon, conclui-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores observados para afluentes e efluentes desta indústria.

Com respeito à indústria 2, seus afluentes apresentaram uma quantidade mínima de 3,6 e uma quantidade máxima >1100. Seus efluentes apresentaram 3 como quantidade mínima de *Listeria* sp. e como quantidade máxima >1100. Pelo Teste de Wilcoxon, concluiu-se não haver diferença significativa entre os valores.

Ao se comparar as quantidades de *Listeria* sp. obtidas nos afluentes das duas indústrias, pelo Teste de Wilcoxon, observou-se não haver diferença significativa.

As quantidades de *Listeria* sp. obtidas nas amostras de afluentes e efluentes da indústria 1 e indústria 2 podem ser vistas nas Tabelas I e II, respectivamente.

A quantidade de bactérias obtidas nos isolamentos positivos, através da técnica de NMP, não diferiu significativamente, pelo tratamento estatístico utilizado, nos afluentes e efluentes de ambas as indústrias, observando-se uma variação muito grande entre os valores máximos e mínimos que, se não foi significativa, pode ter sido em função do Teste de Wilcoxon, o qual julgou-se ser o mais adequado em virtude dos valores >1100 que, pela sua natureza, impediram a utilização de estatística paramétrica.

Tabela I - NMP de bactérias do gênero *Listeria* presentes em amostras de afluentes e efluentes de matadouro frigorífico dotado de sistema de tratamento de efluentes, localizado na cidade de Goiânia, Estado de Goiás, no período de dezembro de 1990 a fevereiro de 1991

Número de Amostras	NMP*	
	Afluentes	Efluentes
9B 10 <sup>1</sup> 9B 10 <sup>1</sup> 9B210 <sup>1</sup>		6,0
12B210 <sup>1</sup>		9,0
15B110 <sup>1</sup> 15B210 <sup>0</sup>		240,0
20B510 <sup>0</sup>		23,0
19A210 <sup>1</sup> 19A310 <sup>1</sup> 19A 10 <sup>1</sup>	23,0	
21A310 <sup>0</sup> 21A410 <sup>0</sup>	9,4	
21B110 <sup>1</sup> 21B210 <sup>0</sup>		240,0
27A110 <sup>0</sup> 27A210 <sup>1</sup> 27A310 <sup>1</sup> 27A710 <sup>1</sup>	95,0	
27B410 <sup>0</sup> 27B310 <sup>1</sup>		19,0
28A110 <sup>1</sup> 28A310 <sup>0</sup>	39,0	
28B210 <sup>1</sup> 28B510 <sup>0</sup> 28B610 <sup>0</sup> 29A110 <sup>0</sup> 29A1010 <sup>1</sup>	16,0	>1100,0
29B910 <sup>1</sup> 29B1310 <sup>0</sup>		26,0
30A210 <sup>1</sup>	9,0	
30B110 <sup>1</sup> 30B 10 <sup>0</sup> 30B410 <sup>1</sup>		>1100
31A410 <sup>0</sup> 31A610 <sup>1</sup> 31A1010 <sup>1</sup>	16,0	
31B110 <sup>0</sup> 31B 10 <sup>1</sup> 31B210 <sup>1</sup>		>1100
34A510	9,1	
34B310 <sup>0</sup> 34B 10 <sup>0</sup>		240,0
35A410 <sup>0</sup> 35A 10 <sup>1</sup>	43,0	
35B210 <sup>0</sup> 35B110 <sup>1</sup>		12,0

(\*) Em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por 100 mililitros de amostra

Tabela II - NMP de bactérias do gênero *Listeria* presentes em amostras de afluentes e efluentes de um matadouro frigorífico desprovido de sistema de tratamento de efluentes, localizado na cidade de Goiânia, Estado de Goiás, no período de abril a junho de 1991

Número de Amostras	N M P*	
	Afluentes	Efluentes
37A10 <sup>1</sup>	23,0	
39B110 <sup>1</sup> 39B210 <sup>1</sup>		95,0
41B210 <sup>1</sup>		9,0
43B510 <sup>1</sup> 43B710 <sup>1</sup>		240,0
44A110 <sup>1</sup> 44A210 <sup>1</sup> 44A510 <sup>1</sup>	>1100	
44B110 <sup>1</sup> 44B310 <sup>1</sup> 44B410 <sup>1</sup> 44B10 <sup>1</sup>		>1100
45A110 <sup>1</sup> 45A110 <sup>1</sup> 45A10 <sup>1</sup>	>1100	
45B10 <sup>1</sup> 45B610 <sup>1</sup>		19,0
46B310 <sup>1</sup>		3,6
48B10 <sup>1</sup>		3,0
50A10 <sup>1</sup>	9,1	
50B10 <sup>1</sup> 50B10 <sup>1</sup>		7,3
52B10 <sup>1</sup> 52B10 <sup>1</sup>		7,3
53A510 <sup>1</sup> 53A710 <sup>1</sup>	14,0	
53B510 <sup>1</sup> 53B210 <sup>1</sup>		39,0
54B210 <sup>1</sup> 54B410 <sup>1</sup>		15,0
55B10 <sup>1</sup> 55B10 <sup>1</sup>		240,0
56B10 <sup>1</sup> 56B10 <sup>1</sup>		19,0
57B100 <sup>1</sup> 57B10 <sup>1</sup>		13,0
58B10 <sup>1</sup> 58B10 <sup>1</sup> 58B10 <sup>1</sup>		20,0
59A10 <sup>1</sup>	3,6	

Continua...

continuação...

Número de Amostras	NMP*	
	Afluentes	Efluentes
59B10 <sup>0</sup> 59B10 <sup>1</sup> 59B10 <sup>2</sup>		27,0
60A10 <sup>0</sup> 60A10 <sup>1</sup> 60A10 <sup>2</sup>	15,0	
60B10 <sup>0</sup> 60B10 <sup>1</sup> 60B10 <sup>2</sup>		110,0
61A10 <sup>0</sup> 61A10 <sup>1</sup>	6,1	
61B10 <sup>0</sup>		3,0
62A10 <sup>0</sup> 62A10 <sup>1</sup>	93,0	
62B10 <sup>0</sup>		9,1
63A10 <sup>0</sup> 63A10 <sup>1</sup>	14,0	
63B10 <sup>0</sup> 63B10 <sup>1</sup>		6,1
64A10 <sup>0</sup> 64A10 <sup>1</sup> 64A10 <sup>2</sup>	28,0	
64B10 <sup>0</sup> 64B10 <sup>1</sup>		20,0
65A10 <sup>0</sup> 65A10 <sup>1</sup> 65A10 <sup>2</sup>	150,0	
65B10 <sup>0</sup> 65B10 <sup>1</sup>		9,3
66A10 <sup>0</sup> 66A10 <sup>1</sup> 66A10 <sup>2</sup>	20,0	
66B10 <sup>0</sup> 66B10 <sup>1</sup> 66B10 <sup>2</sup>		75,0
67A10 <sup>0</sup> 67A10 <sup>1</sup>	7,3	
67B10 <sup>0</sup> 67B10 <sup>1</sup>		240,0
68A10 <sup>0</sup> 68 68A10 <sup>1</sup> A10	20,0	
68B10 <sup>0</sup> 68B10 <sup>1</sup>		20,0
69A10 <sup>0</sup> 69 A10	7,3	
70A10 <sup>0</sup> 70A10 <sup>1</sup> 70A10 <sup>2</sup>	20,0	

(\*) Em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por 100 mililitros de amostra

## CONCLUSÕES

Ambas as indústrias já captam água contaminada por *Listeria* sp. O sistema de tratamento de efluentes da indústria 1 não influi sobre a quantidade de bactérias. Há necessidade de se desenvolver e/ou de adaptação de novas técnicas e procedimentos que sejam eficazes no extermínio das bactérias do gênero *Listeria* presentes em efluentes de matadouros frigoríficos.

## ABSTRACT

### COUNT OF *Listeria* sp. IN BOVINE SLAUGHTERHOUSES WASTEWATERS OF GOIÁS

One hundred and forty portions of slaughterhouses wastewaters in Goiânia-GO, BRAZIL, were analysed for efficacy of effluents treatment system to *Listeria* sp. and to count this microorganism. With NMP method were concluded, between others answers, than slaughterhouses received water with *Listeria* sp. And that effluents treatment system doesn't had efficacy to these bacteria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-GHAZALI, M.R. & AL-AZAWI, S.K. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in a sewage treatment plant in Iraq. *Journal of Applied Bacteriology*, v.60, p.251-254, 1986.
- BOHM, R. Possible ways of disinfecting slaughterhouse effluent. *Fleischwirtschaft*, v.69, p.1700-1702, 1980.
- BUCHANAN, R.L.; SMITH, J.L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. *Listeria* methods development research at the Eastern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists*. V.71, p.651-654, 1988.
- CROOK, J. Water reuse in California. *Journal of the American Water Workers Association*. V.77, n.7, p.60-71, 1985.

- CURTIS, G.D.W., MITCHEL, R.G.; KING, A.F.; GRIFFIN, E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, v.8, n.8, p.95-98, 1989.
- DIJKSTRA, R.G. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B.*, v.176, p.202-205, 1982.
- FENLON, D.R. Rapid quantitative assesment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. *Vet. Record*, v.118, p.240-242, 1986.
- GENEVICH, H.H.; MULLER, H.E.; SCHRETTENBRUNNER, A.; SHEELIGER, H.P.R. The occurrence of different *Listeria* species in municipal waste water. *Zbl. Bakt. Hyg.*, v.181, p.563-565, 1985.
- HAAS, C.N. Wastewater disinfection and infections disease risks. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, v.17, p.1-20, 1986. HOFER, E. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em água de esgoto. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.73, p.31-28, 1975.
- KAMPELMACHER, E.H.; JANSEN, L.M.V.N. Listeriosis in huamans and animals the Netherlands (1958-1977). *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A*, v.246, p.211-217, 1980.
- McCLAIN, D.; LEE, W.H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *Journal of the Association of the official Analytical Chemists*, v.71, p.660-664, 1988.
- SCHONBERG, A. Prevention and control of listeriosis. *Turkish Journal of Infection*, v.2, p.533-540, 1988.
- WATKINS, J.; SNEATH, K.P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage sludge and river water. *Journal of Applied Bacteriology*, v.50, p-1-9, 1981.