

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS MEMBRANA FILTRANTE E ESPALHAMENTO NA RECUPERAÇÃO DE *Escherichia coli* K12 EM SOLUÇÃO SALINA PROPOSITAMENTE CONTAMINADA

*Comparative analysis between microbiological methods filter membrane
and scattering in the recovery of Escherichia coli K12 in purposely
contaminated saline solution*

Janine Aparecida Correia Durães Gandra¹

Wesley César Silva Machado²

Alexandre Moisés Ericsson de Oliveira³

Hadison Santos Nogueira⁴

Shirley da Silva Gomes Magalhães⁵

Glauco Sanches⁶

Mauro Aparecido de Sousa Xavier⁷

Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier⁷

Resumo: Objetivo: testar e comparar o desempenho dos métodos membrana filtrante e espalhamento na recuperação de culturas puras de *E.coli* K12 em solução salina propositalmente contaminada. **Metodologia:** foram realizadas diluições seriadas a partir de uma ampola, contendo uma concentração conhecida de *E. coli* K12, para obtenção de 3 concentrações diferentes em solução salina, as quais foram analisadas simultaneamente pelos dois métodos. **Resultados:** a taxa de recuperação do método membrana filtrante ($98,0 \pm 1,5\%$) foi superior ao do método de espalhamento ($24,0 \pm 47,6\%$), apresentando diferença estatística significativa ($p=0,0002$) e linearidade ($R^2= 0,9805$). A robustez do tempo de incubação, também foi, aqui, analisada, não havendo diferença significativa nas contagens dos tempos 18, 21 e 24 horas para ambos os métodos. **Conclusão:** os resultados encontrados servirão de linha de base para validação de um método microbiológico capaz de detectar baixas concentrações de *E.coli* em amostras, oriundas de um processo produtivo de uma indústria biotecnológica. Outros parâmetros, como sensibilidade, especificidade, serão avaliados, e, para tal, o meio de cultivo, será substituído por um meio cromogênico, seletivo e diferencial para *E. coli*.

1 Mestrado em Biotecnologia Industrial pela Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES.

2 Novo Nordisk produção farmacêutica do Brasil.

3 Doutorando em Produção Vegetal pela Universidade Federal de Uberlândia - UFU.

4 Graduação em Biomedicina pelo Instituto de Ciências da Saúde - ICS.

5 Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES.

6 Graduação em Farmácia Industrial pela Universidade Federal Fluminense - UFF.

7 Doutorado em Ciências Biológicas (ênfase em Biologia Molecular) pela Universidade de Brasília - UnB.

Autor para correspondência: Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier.

E-mail: ericsson_aerc@yahoo.com.br

Artigo recebido em: 11/02/2017.

Artigo aceito em: 13/05/2017.

Artigo publicado em: 27/06/2017.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; OGM; Detecção; Espalhamento; Membrana filtrante; Recuperação; Humanos.

Abstract: Objective: to test and compare the performance of membrane filtration and scattering methods in the recovery of pure cultures of *E. coli* K12 in purposely contaminated saline solution. **Methodology:** serial dilutions were performed from a well containing *E. coli* K12 concentration to obtain 3 different concentrations in saline solution, which were analyzed simultaneously by the two methods. **Results:** the recovery rate of the filter membrane method ($98.0 \pm 1.5\%$) was higher than that of the scattering method ($24.0 \pm 47.6\%$), presenting a statistically significant difference ($p = 0.0002$) and linearity ($R^2 = 0.9805$). The robustness of the incubation time was also analyzed here with no significant difference in the counts of times 18, 21 and 24 hours for both methods. **Conclusion:** the results found here will serve as the baseline for the validation of a microbiological method capable of detecting low concentrations of *E. coli* in samples from a production process of a biotechnology industry. Other parameters such as sensitivity, specificity will be evaluated and for this the culture medium will be replaced by a selective and differential chromogenic medium for *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*; GMOs; Detection; Spreading; Filter membrane; Recovery.

INTRODUÇÃO

A determinação do número de bactérias em cultura é essencial para a prática científica e industrial.¹ A quantificação de bactérias em uma dada amostra é rotineiramente obtida pela contagem total de unidades formadoras de colônias (UFCs) crescidas em uma placa com ágar, a partir de diluições seriadas, expressas em UFC por grama ou mL da amostra original. Obtém-se, assim, uma estimativa do número de células presentes, baseado em uma interpretação do número de colônias na placa.² A importância de diluições seriadas e contagem de colônias são refletidas no número de procedimentos operacionais padrão e guias regulatórios, que descrevem essa metodologia.³

O método de contagem em placas é baseado em contagem de células viáveis. Este método é realizado diluindo a amostra original em tubos de diluição seriada, seguido de plaqueamento de alíquotas das diluições, preparadas em placas de ágar, apropriadas pelas técnicas de *pour plate* ou *spread plate* (espalhamento). A técnica espalhamento utiliza a adição ou espalhamento da alíquota diluída de uma amostra em uma placa de meio de cultura sólido, o qual é incubado em condições específicas.⁴

Outro método, baseado na enumeração de células viáveis, é o de filtração em membrana (MF). O método MF é conduzido pela filtração de um volume conhecido (tipicamente na faixa de 100 a 1000 mL) de uma amostra líquida, através de uma membrana filtrante de poro tamanho 0,22 ou 0,45 µm. A membrana reterá os micro-organismos, durante a filtração da amostra líquida. Após a filtração, a membrana é transferida para uma placa com meio de cultura sólido e incubada em condições

específicas. O MF tem a vantagem de melhorar a sensibilidade analítica de um ensaio, aumentando o volume de amostra que pode ser testada em um único ensaio.^{4,5} Isto é particularmente importante, quando o número de organismos a serem detectados ou a prevalência de agentes patogênicos em uma amostra são baixos.⁶

Para uma detecção e quantificação confiável de micro-organismos, um método analítico apropriado é necessário. A precisão de um método pode ser avaliada pela adição de quantidades conhecidas de um analito a um produto ou amostra e sua recuperação dentro de uma faixa especificada, dependendo da aplicação do método.⁷ Para testes de enumeração microbiana, é considerado um fator de 2 para a taxa de recuperação. Isto significa que o número de colônias recuperado deve ser não mais que o dobro e não menos que a metade das colônias recuperadas em um controle positivo. Este fator é introduzido por levar em consideração a variação inerente ao método.⁸

A produção de proteínas recombinantes em indústrias biotecnológicas pode ser realizada, utilizando organismos geneticamente modificados (OGM) como aqueles derivados de *Escherichia coli* K12. A principal preocupação em relação à saúde e segurança no uso de OGM está relacionada com o potencial da transferência de genes para outros organismos, toxicidade, indução de resistência a antibióticos e comprometimento da biodiversidade. A liberação acidental de OGM, nos últimos anos, tem aumentado, e, com isso, a preocupação com a segurança e a necessidade de métodos capazes de detectá-los.⁹ A indústria biotecnológica, onde este trabalho foi conduzido, produz uma proteína recombinante em grande escala, utilizando um OGM. Todo resíduo líquido ou sólido contaminado é descontaminado antes de ser descartado, assim

como todo material ou equipamento que tiver entrado em contato com o OGM, conforme legislação vigente.¹⁰ Metodologias que permitam a detecção de hospedeira e ou seus plasmídeos recombinantes proveem uma forma de monitorar a dispersão destes em estação de tratamento de efluente ou em outros ambientes.¹¹

Em trabalho anterior, realizado por este grupo, foi desenvolvido um método molecular baseado em PCR para detecção de *Escherichia coli* K-12 carreando gene de resistência a ampicilina em lagoa de estação de tratamento de efluente.⁹ O método molecular desenvolvido foi antecedido por um método microbiológico, espalhamento em placa dependente de cultivo, já que a análise é realizada no intuito de monitorar a presença de micro-organismos viáveis carreando o gene de interesse.¹⁰ Metodologias microbiológicas que permitam aumentar o limite de detecção da hospedeira *Escherichia coli* K-12 são desejáveis.

O objetivo deste estudo foi realizar uma análise comparativa entre os métodos microbiológicos membrana filtrante e espalhamento na recuperação de *Escherichia coli* K12, propositalmente inoculada em solução salina.

METODOLOGIA

Linhagem bacteriana

O micro-organismo utilizado, neste estudo, foi a *Escherichia coli* W3110, transformada com plasmídeo pUC18 genotipada, conforme Simões *et al.*¹¹ Culturas puras desse micro-organismo foram previamente quantificadas (aproximadamente $5,0 \times 10^9$ UFC/ml/frasco) e preservadas em glicerol a 20% e estocadas a -80°C .

Método de espalhamento

Foram realizadas diluições seriadas, a partir de um tubo criopreservado contendo o micro-or-

ganismo teste, a fim de que as concentrações de 5 UFC/100 mL, 50 UFC/100 mL e 100 UFC/100 mL pudessem ser obtidas nas suspensões em solução salina 0,9%. Em triplicata, foram inoculados 100 μL , utilizando-se pipeta automática (Eppendorf research), diretamente em placas contendo meio TSA (BD, Difco TM), suplementado com ampicilina (Sigma-Aldrich, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) das concentrações de 5UFC, 50UFC e 100UFC. A alíquota foi espalhada em cada placa, utilizando-se alça para esfregaço formato L descartável e estéril (CRAL). Foi realizado, também, um controle negativo, inoculando-se 100 μL da solução salina, utilizada diretamente em placas, contendo meio TSA (BD, Difco TM) suplementado com ampicilina (Sigma-Aldrich, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

As placas foram incubadas a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$, durante 24 horas. Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica (Telstar, Bio II Advance), prevenindo contaminações com micro-organismos do ar. Para determinação da robustez do tempo de incubação, as placas foram lidas nos tempos 18, 21 e 24 horas.¹² Os resultados da leitura das placas em UFC foram registrados em uma planilha Excel, programada para calcular automaticamente a taxa de recuperação, conforme equação, citada anteriormente.

Método de membrana filtrante

Foram realizadas diluições seriadas, a partir de um tubo criopreservado, contendo o micro-organismo teste, a fim de que as concentrações de 5 UFC/100 mL, 50 UFC/100 mL e 100 UFC/100 mL pudessem ser obtidas nas suspensões em solução salina 0,9%. Em triplicata, foram filtrados 100 mL, contendo 5UFC, 50UFC e 100UFC, com auxílio de um sistema de filtração a vácuo (bomba a vácuo EZ-STREAM e manifold EZ-FIT TRES, Merck Millipore), acoplada com uma membrana com poro 0,45 μm . Após filtração, as membranas foram adicionadas diretamente em placas, contendo meio

GANDRA, J. A. C. D.; MACHADO, W. C. S.; OLIVEIRA, A. M. E.; NOGUEIRA, H. S.; MAGALHÃES, S. S. G.; SANCHES, G.; XAVIER, M. A. S.; XAVIER, A. R. E. O.

TSA (BD, Difco™), suplementado com ampicilina (Sigma-Aldrich, 200µg/mL) e incubadas a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$, durante 24 horas.

A mesma metodologia foi seguida para o controle negativo, em que foi filtrado 100 mL da solução salina utilizada. Para determinação da robustez do tempo de incubação, as UFC, presentes nas placas, foram contadas com o auxílio do contador de colônias (CP600 plus, Phoenix) nos tempos 18, 21 e 24 horas. Os resultados da contagem das UFC nas placas foram registrados em uma planilha Excel, programada para calcular automaticamente a taxa de recuperação, conforme equação, citada anteriormente.

Ambos os métodos de membrana filtrante e espalhamento foram repetidos três vezes e todas com triplicatas para as diferentes concentrações do micro-organismo teste. Como controle positivo para o cálculo da taxa de recuperação, foram, previamente, realizadas diluições seriadas em solução salina 0,9%, a partir do mesmo tubo, para quantificação do micro-organismo teste.

Cálculo da taxa de recuperação e faixa de trabalho

A taxa de recuperação do micro-organismo, propositalmente inoculado em meio de cultivo TSA (*Tryptcase Soya Agar*), foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Taxa de recuperação} = \frac{\text{Média da placa teste} \times 100}{\text{Média da placa controle}}$$

Foi estabelecido o critério de que a contagem média do micro-organismo deveria estar no intervalo de 50 a 200%, conforme procedimentos internos do laboratório e em conformidade com USP 37 (8). Os valores obtidos da taxa de recuperação foram convertidos em escala logarítmica antes de serem estatisticamente analisados. A faixa de

trabalho escolhida, para análise da linearidade dos métodos membrana filtrante e espalhamento, foi de 5 a 100 UFC em experimentos de contaminação e recuperação do micro-organismo teste. O racional para essa escolha foi o provável uso deste método para a detecção de presença de baixas concentrações de *E.coli k12* em etapas do processo produtivo de uma proteína recombinante produzida em escala industrial.

Linearidade

A linearidade do método de membrana filtrante foi avaliada para as faixas de trabalho de 5 a 100 UFC/100 mL de *E. coli* K12.

Robustez

Foi avaliada a robustez do período de incubação de $21 \pm 3\text{h}$. Para isso, nove amostras de solução salina propositalmente contaminadas com concentrações de 5 a 100 UFC/100 mL de *E. coli* K12 foram filtradas ou diretamente inoculadas em triplicata em placas, contendo meio AST. Essas amostras foram incubadas a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ e a contagem de colônias foi realizada nos tempos de 18, 21 e 24h.

Análise estatística

A comparação entre os parâmetros avaliados nos procedimentos analíticos foi realizada, com base em testes estatísticos T pareado e ANOVA com nível de significância de 95%, utilizando-se o software Minitab.V16. As tabelas e os gráficos foram gerados no Excel.

RESULTADOS

Aspecto macroscópico do crescimento colônias de E.coli previamente genotipadas

A Figura 1 mostra o aspecto macroscópico do crescimento das colônias de *Escherichia coli*, obtidas pelos métodos de membrana filtrante e espalhamento de uma das rodadas dos 3 experimentos de contaminação e recuperação.

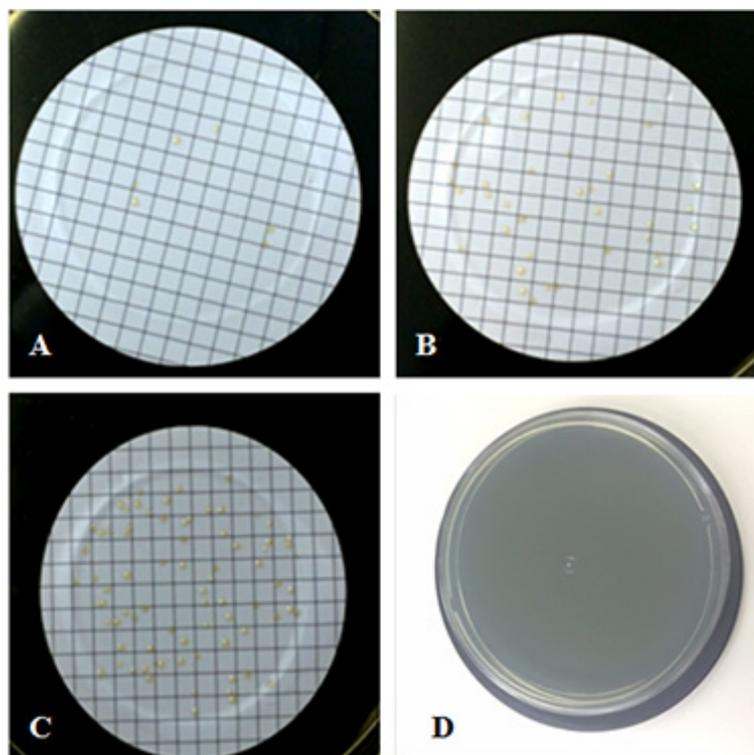


Figura 1 - Aspecto do crescimento das colônias de *Escherichia coli* K12, obtidas pelos métodos membrana filtrante e espalhamento. Painel A a C: Filtros de membrana propositalmente inoculados com as concentrações padronizadas de 5UFC/100 mL, 50UFC/100 mL e 100UFC/100 mL, respectivamente, crescidos em meio TSA. Painel D: Placa contendo meio TSA, inoculada diretamente com concentração padronizada de 100UFC/100 mL (método espalhamento).

Taxa relativa de recuperação

A taxa relativa de recuperação das colônias, obtidas pelos métodos de membrana filtrante e espalhamento, foi de $98,0 \pm 1,5\%$ e $24,0 \pm 47,6\%$, respectivamente (Tabela 1 e Figura 2). A análise comparativa da capacidade de recuperação entre os métodos MF e espalhamento mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre eles ($p= 0,002$). Não houve crescimento microbiano nos controles negativos realizados para ambos os métodos.

Tabela 1 - Características do desempenho dos métodos membrana filtrante e espalhamento na recuperação de *Escherichia coli* K12.

Parâmetro	Espalhamento	Membrana Filtrante
Média da taxa de recuperação	24,0%	98,0%
Robustez do tempo de incubação	Ausência de diferença significativa nas contagens nos tempos 18, 21 e 24 horas de incubação em ambos os métodos.	

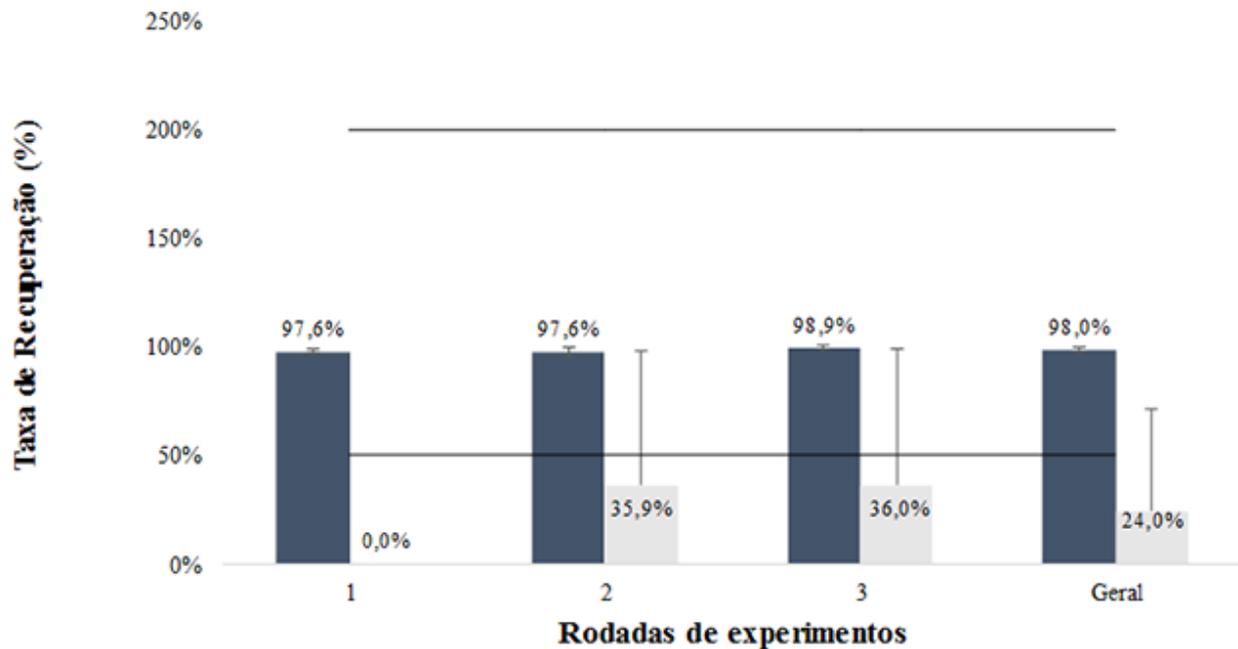


Figura 2 – Percentual da taxa de recuperação de *Escherichia coli* k12 pelos métodos membrana filtrante e espalhamento. Os números 1, 2 e 3 indicam a taxa de recuperação, calculada nas três rodadas do experimento de contaminação/recuperação. A média geral da recuperação, também, é mostrada. As barras cinza escuro e cinza claro representam, respectivamente, os resultados da recuperação pelo método membrana filtrante e espalhamento. Os limites superiores e inferiores, especificados para a contagem, são mostrados (50 a 200%).

Robustez do tempo de incubação

Robustez significa a tolerância em relação a pequenas mudanças no procedimento ou no sentido de variações inevitáveis em condições do ambiente de trabalho.¹² Para investigar essa influência, nove amostras de solução salina, propositalmente contaminadas com concentrações estabelecidas de *E.coli*, foram filtradas ou diretamente inoculadas em triplicatas de placas, contendo meio AST. Para o método de espalhamento, não houve diferença significativa entre as contagens das placas nos tempos 18, 21 e 24 horas ($p=1,000$). No método membrana filtrante, foram observados os seguintes aumentos na contagem das colônias: 18 a 21 horas = $1,5 \pm 2,8\%$ ($p= 0,138$); 21 a 24 horas = $2,0 \pm 3,3\%$ ($p= 0,237$); 18 a 24 horas = $3,7 \pm 5,5\%$ ($p=0,157$). Ainda que apresentando pequenas variações entre

as contagens nos 3 tempos estabelecidos para os métodos MF e espalhamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0,517$) (Tabela 1).

Faixa de trabalho e linearidade do método membrana filtrante

A linearidade é definida como a capacidade de um procedimento analítico em obter resultados de um ensaio dentro de um determinado intervalo, os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra.¹² A Figura 3 mostra a linearidade do método membrana para as faixas de trabalho 5 a 100 UFC/100 mL. Para o método de espalhamento, não foi possível determinar a linearidade, uma vez que esse método falhou na recuperação das colônias.

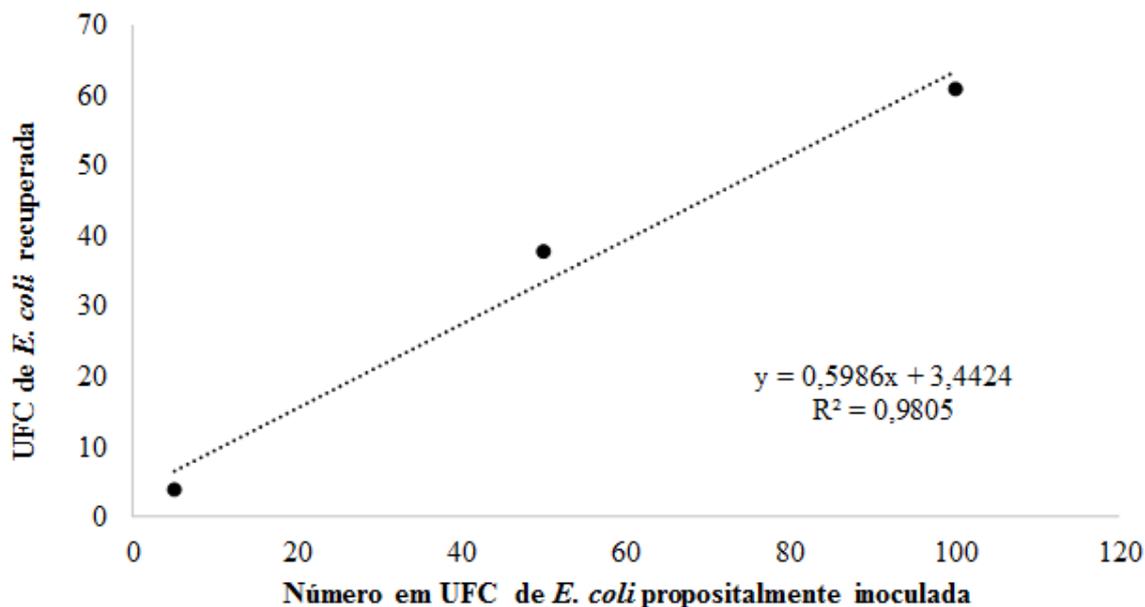


Figura 3 - Linearidade do método membrana filtrante na recuperação de *Escherichia coli* K12, propositalmente inoculada em meio de cultivo. Os valores da média das contagens em UFC das três rodadas do experimento de contaminação/recuperação para as concentrações de 5UFC, 50UFC e 100UFC, são mostrados: *Escherichia coli* K12.

DISCUSSÃO

Para a avaliação da eficácia dos métodos MF e espalhamento, aqui estudados, foi necessário utilizar um material de referência com um número de bactérias bem definido. Um banco de células constituído por uma cultura pura de *E. coli*, previamente genotipada, foi utilizado nesta pesquisa. O uso da cultura pura, previamente quantificada, assegura a concentração do inóculo testada e permite uma melhor avaliação do método de enumeração bacteriana. O mesmo princípio foi aplicado por Wohlsen *et al.*¹⁶ que utilizaram culturas puras de bactérias congeladas, de concentração conhecida, e fizeram a enumeração dessas bactérias pelo método tradicional de contagem de colônias recuperadas em placas de ágar. Nesta pesquisa, foram utilizadas diluições seriadas que permitiram a contagem de colônias isoladas nas placas, conforme Herigstad *et al.*¹⁷

Através da avaliação macroscópica das colônias, após o período de incubação das placas

analisadas pelos métodos MF e espalhamento, foi possível observar a presença do micro-organismo alvo nas placas referentes ao método MF (Figura 1). Esse mesmo procedimento foi realizado por Bogosian *et al.*¹⁸ em experimentos de contaminação e recuperação, utilizando linhagens de *Escherichia coli* K-12, em que ele determinou o limite de detecção para *E. coli* K12 em solo e água, através da inoculação pelo método de espalhamento em meios de cultura específicos. O padrão de crescimento, apresentado na Figura 1 para o método MF, demonstra coerência com as concentrações inoculadas em cada placa, neste estudo (Figura 1, Painéis A a C). No entanto, para as placas utilizadas no método de espalhamento não foi possível visualizar crescimento. (Figura 1, Painel D).

Para cada método, a média do número de colônias recuperadas foi comparada com os valores obtidos no controle positivo. Em nosso trabalho, os valores obtidos para a taxa de recuperação em UFC foram convertidos para escala logarítmica antes da análise estatística, visto que contagens microbianas

GANDRA, J. A. C. D.; MACHADO, W. C. S.; OLIVEIRA, A. M. E.; NOGUEIRA, H. S.; MAGALHÃES, S. S. G.; SANCHES, G.; XAVIER, M. A. S.; XAVIER, A. R. E. O.

não são dados normalmente distribuídos^{6,15}. Conforme mostrado na Tabela 1, a taxa de recuperação para o micro-organismo, alvo no método MF, foi elevada, bem como um desvio padrão baixo. Em contrapartida, o método de espalhamento apresentou uma taxa de recuperação baixa, além de um desvio padrão muito elevado, o que indica a baixa confiabilidade e reprodutibilidade do método.

Os resultados da taxa de recuperação da *E. coli* estiveram dentro dos limites superior e inferior de controle (50 a 200%) para o método MF nos três experimentos realizados (97,6%, 97,6% e 98,9%), enquanto que para o método de espalhamento, em nenhum dos testes se obteve uma taxa de recuperação dentro dos limites aceitáveis (Figura 2). O teste 2T pareado realizado confirmou a diferença estatística significativa entre o método de espalhamento e MF na recuperação do micro-organismo em questão, sendo $p < 0,05$.

Reasoner¹⁴ descreve que a temperatura de incubação tem um efeito significativo nos resultados de qualquer método de contagem em placas. No entanto, a escolha da temperatura de incubação pode ser ditada por guias regulatórios.¹⁶ Tendo em vista que este estudo foi realizado, conforme procedimentos internos do laboratório e em conformidade com USP 37 (8), a temperatura de incubação utilizada foi aquela sugerida no estudo. O aspecto de robustez, avaliado neste trabalho, foi a variação no período de incubação de 21 ± 3 h, o qual foi considerado de maior relevância para o laboratório.

O aumento na contagem de colônias em um período de incubação é um fenômeno conhecido. Porém, desde que o aumento na contagem, após todo o período de incubação, não seja excessivo, por considerações práticas e operacionais, o período de incubação pode ser considerado aceitável.¹² Os dados sobre o período de incubação em nosso trabalho, analisados pelo teste ANOVA, revelaram

não haver variação significativa na contagem das colônias nos intervalos entre 18 e 21h e 21 e 24h. Portanto, o tempo de incubação é robusto, nesta faixa, para ambos métodos testados na faixa de temperatura utilizada.

O gráfico de linearidade, apresentado na Figura 3 deste trabalho, mostrou que as colônias de *E. coli* puderam ser contadas de maneira confiável na faixa de 5 a 100 UFC, pelo método MF. O número de colônias recuperadas foi diretamente proporcional à concentração de micro-organismos, propositalmente inoculada, nas amostras testadas. Esse mesmo resultado foi obtido por Lange *et al*¹². O coeficiente de correlação obtido foi significativo para o método, aqui testado ($r^2=0,9806$) (Figura 3). Coeficiente similar a este foi obtido por Dafale *et al*¹⁹ na validação de um ensaio microbiológico para quantificação de ceftriaxone sódico.

O método de espalhamento, aqui testado, revelou ser mais laborioso do que o método MF, pois requereu o espalhamento manual da amostra na superfície do ágar, utilizando alça estéril. Reasoner¹⁴ sugere esse ponto como uma desvantagem do método em questão. O método de espalhamento, utilizado em nossa pesquisa, foi reproduzido, conforme descrito no procedimento operacional padrão da indústria biotecnológica onde o teste foi realizado. Para tal, um volume de amostra muito pequeno (0,1 mL) é analisado, o que reduz consideravelmente a sensibilidade do método. Esse dado corrobora com a obtenção de taxas de recuperação inferiores a faixa de trabalho, aqui estabelecida para o método de espalhamento (Figura 2).

O método MF é um método flexível para contagem heterotrófica de placas.¹⁴ Apesar de requerer mais equipamentos, uma fonte de vácuo e membranas especiais de tamanho de poro controlado, que o tornam relativamente mais oneroso, quando comparado com o método de espalhamento, o

método MF apresentou várias vantagens. A análise de um grande volume de amostra é uma delas, pois leva a uma maior sensibilidade e confiabilidade.¹³

Entretanto, o método MF possui algumas limitações. Amostras que apresentam alta turbidez, viscosidade ou ambos, podem inviabilizar o uso do método de filtração, que é mais aplicável em amostras com menores quantidades de partículas. O método MF pode ser utilizado em amostras com alta turbidez, desde que estas tenham carga microbiana suficientemente alta, que permita diluição antes do plaqueamento.⁶

CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a eficiência do método de membrana filtrante, comparado ao método de espalhamento na recuperação de *E. coli* K12 propositalmente inoculada em meio de cultivo. Os resultados revelaram que o método MF foi superior ao método de espalhamento em relação à capacidade de recuperar diferentes concentrações de *E. coli*, inoculadas em amostras. Foi possível calcular e verificar a linearidade somente para método de MF. A possibilidade de aumentar o volume da amostra, a ser analisada pelo MF, resultará no aumento da capacidade de detecção de micro-organismos, presentes em menor quantidade nessas amostras. Os resultados, aqui encontrados, servirão de linha de base para validação de um método microbiológico capaz de detectar baixas concentrações de *E. coli* em amostras oriundas de etapas *dowstream* de um processo produtivo de uma indústria biotecnológica. Outros parâmetros como sensibilidade, especificidade e precisão serão avaliados nesta validação, e, para tal, o meio de cultivo será substituído por um meio cromogênico seletivo e diferencial para *E. coli*. Tal substituição se faz vantajosa por per-

mitir uma alta recuperação do micro-organismo de interesse dentre outros possíveis contaminantes, que poderão estar presentes em amostras, oriundas de um processo fermentativo ou descarte acidental¹² Colônias isoladas pelo método de membrana filtrante em meio cromogênico, presuntivamente consideradas como *E. coli*, serão submetidas à identificação molecular para confirmação e ou exclusão por se tratarem da linhagem *Escherichia coli* W3110, contendo o plasmídeo pUC18¹¹

AGRADECIMENTOS

Ao programa de mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Montes Claros e a Novo Nordisk Produção Farmacêutica do Brasil, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

01. SZERMER-OLEARNIK, B. *et al.* Comparison of microbiological and physicochemical methods for enumeration of microorganisms. *Postepy Hig Med Dosw.* v. 68, p. 1392-6, jan. 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/25531702/>>. Acesso em: 08 Fev. 2017.
02. DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods.* v. 103, p. 9-17, ago. 2014.
03. BEN-DAVID, A.; DAVIDSON, C. E. Estimation method for serial dilutions experiments. *Journal*

GANDRA, J. A. C. D.; MACHADO, W. C. S.; OLIVEIRA, A. M. E.; NOGUEIRA, H. S.; MAGALHÃES, S. S. G.; SANCHES, G.; XAVIER, M. A. S.; XAVIER, A. R. E. O.

- of Microbiological Methods*. v. 107, p. 214-21, dez. 2014.
04. GOLDMAN, E.; GREEN, L. H. (Org.). *Practical Handbook of Microbiology*. 3. ed. Florida: CRC Press, 2015.
05. WU, V. C. H. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. v. 25, n. 8, p. 735-44, set. 2008.
06. HEREDIA, N. *et al.* Validation of a novel rinse and filtration method for efficient processing of fresh produce samples for microbiological indicator enumeration. *Journal of Food Protection*. v. 78, n. 3, p. 525-30, mar. 2015
07. ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Chicago, USA, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em 20 Mar. 2016.
08. USP. *Microbiologi <61>*. Disponível em: <<https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c61.pdf>>. Acesso em: 15 Mar. 2 *cal Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests* 016.
09. GANDRA, J. A. C. D. *et al.* Molecular and microbiological methods for *Escherichia coli* K12 traceability in the fermentation process. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*. v. 5, n. 6, out. 2015.
10. BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução Normativa Nº 2, de 27 de novembro de 2006. *Diário Oficial da União*. 27 Nov. 2006. Disponível em: <<http://agrobiobrasil.org.br/wpcontent/uploads/2013/11/RESOLU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-2-DE-27-DE-NOVEMBRO-DE-2006.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2017.
11. SIMÕES, G. A. R. *et al.* Genetic markers for detection of *Escherichia coli* K-12 harboring ampicillin-resistance plasmid from an industrial wastewater treatment effluent pond. *Genetics and molecular research*. v. 15, n. 2, jun. 2016.
12. LANGE, B.; STRATHMANN, M.; OßMER, R. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. v. 57, n. 6, p. 547-53, dez. 2013.
13. ROMPRE, A. *et al.* Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. v. 49, n.1, p. 31-54, mar. 2002.
14. REASONER, D. J. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *International Journal of Food Microbiology*. v. 92, n. 3, p. 307-15, mai. 2004.
15. BOUBETRA, A. *et al.* Validation of alternative methods for the analysis of drinking water and

- their application to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 77, n. 10, p. 3360-7, mai. 2011.
16. WOHLSEN, T. *et al.* Evaluation of the methods for enumerating coliform bacteria from water samples using precise reference standards. *Letters in Applied Microbiology*. v. 42, n. 4, p.350-6, abr. 2006.
17. HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. v. 44, n. 2, p. 121-9, mar. 2001.
18. BOGOSIAN, G. *et al.* Death of *Escherichia coli* K-12 strains W3110 in soil and water. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 11, p. 4114-20, nov. 1996.
19. DAFALE, N. A. *et al.* Quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical preparations by a new validated microbiological bioassay. *Analytical Methods*. v. 4, n. 8, p. 2490-8, jul. 2012.