

# ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE RAÇÃO ALTERNATIVA PRODUZIDA A PARTIR DE RESÍDUOS ALIMENTÍCIOS DOMICILIARES.

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP
EXEMPLAR REVISADO .
Data de entrada no Serviço: 10 / 11 / 00
Ass.: Danilo

Dimitrios Efstratios Kondogorgos



Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Hidráulica e Saneamento

ORIENTADOR: Harry Edmar Schulz

DEDALUS - Acervo - EESC



31100016784

São Carlos  
2000

Class.	TESE-EESC
Curr.	2846
Tombo	T0247/00

31100016784

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

K82a Kondogeorgos, Dimitrios Efstratios  
Análise microbiológica de ração alternativa  
produzida a partir de resíduos alimentícios  
domiciliares / Dimitrios Efstratios Kondogeorgos. --  
São Carlos, 2000.

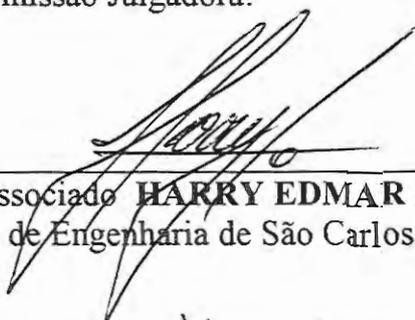
Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de  
São  
Carlos-Universidade de São Paulo, 2000.  
Área: Hidráulica e Saneamento.  
Orientador: Prof. Dr. Harry Edmar Schulz.

1. Microbiologia. 2. Resíduos sólidos.  
3. Reciclagem. 4. Ração. I. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

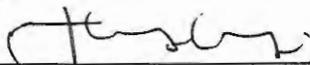
Candidato: Bacharel **DIMITRIOS EFSTRATIOS KONDOGEORGOS**

Dissertação defendida e aprovada em 01-09-2000  
pela Comissão Julgadora:



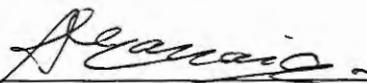
---

Prof. Associado **HARRY EDMAR SCHULZ (Orientador)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



---

Prof. Doutor **JORGE DE LUCAS JÚNIOR**  
(UNESP - Campus de Jaboticabal)



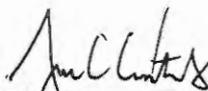
---

Prof. Doutor **ARMANDO DA COSTA MANAIA**  
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



---

Prof. Associado **EDUARDO CLETO PIRES**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Hidráulica e Saneamento



---

**JOSÉ CARLOS A. CINTRA**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. Revisão da Literatura .....	16
3.1 Impactos ambientais da matéria orgânica dos resíduos .....	16
3.2 Reciclagem da matéria orgânica .....	18
3.3 Coleta Seletiva .....	19
3.4 Processamento .....	21
3.5 Amostragem.....	22
3.6 Solubilização.....	23
3.7 Aspectos Técnicos e Legais do Exame Microbiológico de Rações.....	23
3.8 Exame Microbiológico .....	28
3.8.1 Contagem de mesófilos aeróbios totais.....	29
3.8.2 Contagem de bolores e leveduras.....	30
3.8.3 Contagem de coliformes totais, fecais e pesquisa de <i>E. coli</i> .....	30
3.8.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	31
3.8.5 Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
3.8.6 Enumeração de <i>B. cereus</i> .....	32
4. Material e Métodos .....	33
4.1 Coleta Seletiva .....	33
4.2 Processamento do Material Coletado.....	38
4.2.1 Escolha de Utensílios e Equipamentos.....	38
4.2.2 Trituração.....	38
4.2.3 Tratamento Térmico .....	39
4.2.4 Desidratação em estufa a 60 <sup>o</sup> C com ventilação forçada.....	41
4.3 Exame Microbiológico .....	42
4.3.1 Amostragem.....	43
4.3.2 Solubilização e diluição das amostras.....	43
4.3.3 Contagem padrão de mesófilos aeróbios totais viáveis.....	44

4.3.4	Contagem de Bolores e Leveduras.....	44
4.3.5	Contagem de coliformes totais e fecais.....	47
4.3.5.1	Método dos tubos múltiplos.....	47
4.3.5.2	Pesquisa de <i>E. coli</i> .....	51
4.3.6	Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	53
4.3.7	Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
4.3.8	Enumeração de <i>Bacillus cereus</i> .....	57
5.	Resultados.....	59
5.1	Coleta seletiva.....	59
5.1.1.	Processamento do material coletado.....	60
5.2.	Exame microbiológico.....	61
5.2.1.	Contagem de bolores e leveduras.....	61
5.2.2.	Contagem padrão em placa PCA.....	62
5.2.3.	Contagem de coliformes totais e de <i>E. coli</i> .....	63
5.2.3.1.	Método dos tubos múltiplos (NMP).....	63
5.2.3.2.	Contagem em placas com meio seletivo EMB.....	66
5.2.4.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	66
5.2.5.	Enumeração de <i>Bacillus cereus</i> .....	67
5.2.6.	Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	68
6.	Discussão.....	70
6.2.	Exame microbiológico.....	71
6.3.	Viabilidade do processo.....	72
7.	Conclusões.....	74
8.	Anexos.....	75
8.1.	Meios de cultura.....	75
8.2.	Adequação do Laboratório de Resíduos Sólidos.....	78
8.3.	Secretaria de Vigilância Sanitária Portaria n° 451 de 19 de setembro de 1997 . .....	81
9.	Referências bibliográficas.....	82

## Índice de tabelas

Tabela 3.7 Agentes, sintomas, e prováveis alimentos responsáveis pela intoxicação alimentar.....	25
Tabela 4.1 – Dados sobre a população do bairro Santa Felícia voluntária para o programa de coleta seletiva. ....	37
Tabela 4.3.2 diluição de amostras sólidas.....	44
Tabela 5.1 Dados sobre a Coleta seletiva .....	59
Tabela 5.2.1 Resultados da contagem de bolores e leveduras .....	62
Tabela 5.2.2 Resultados de contagem de mesófilos totais viáveis em PCA.....	63
Tabela 5.2.3.1 a Resultados de pesquisa de Coliformes totais e <i>E.coli</i> segundo o método de tubos múltiplos 1º exame .....	63
Tabela 5.2.3.1 b Resultados de pesquisa de Enterobactérias totais viáveis e <i>E.coli</i> segundo o método de tubos múltiplos 2º exame.....	64
Tabela 5.2.3.1 c NMP de enterobactérias totais viáveis (parcial positivo).....	65
Tabela 5.2.5 Resultados da enumeração de <i>B. cereus</i> .....	67

## Índice de figuras

Figura 4.1 Conteúdo do folheto explicativo.....	33
Figura 4.1 (continuação) Conteúdo do folheto explicativo .....	34
Figura 4.2.3 Esquema geral de autoclave .....	38
Figura 4.3 Sala Asséptica.....	40
Figura 4.3.3 Contagem de bolores e leveduras e contagem de mesófilos totais viáveis .....	44
Figura 4.3.5.1 Contagem de coliformes totais e fecais ( tubos múltiplos).....	47
Figura 4.3.5.2 Contagem de Coliformes totais e fecais (contagem em placas) .....	50
Figura 4.3.6 Pesquisa de <i>salmonella</i> .....	52
Figura 4.3.7 Pesquisa de <i>Staphilococcus aureus</i> .....	54
Figura 4.3.8 Pesquisa de <i>Bacillus cereus</i> .....	56
Figura 5.2.1 Contador de colônia.....	60
Figura 5.2.3.1 a Microfotografia de Bacilos incubados em caldo lactosado simples repicado a partir de tubos múltiplos.....	62
Figura 5.2.3.1 b Exame de tubos múltiplos 45 <sup>0</sup> C (A), Prova confirmatória em CLS e CLD (B) e CVB (C).....	63
Figura 5.2.3.1 c Exame de tubos múltiplos 37 <sup>0</sup> C ração autoclavada.....	64
Figura 5.2.5. Agar Mossel (acima) e prova de redução de nitrato (abaixo) .....	66
Figura 5.2.6 Agar Chapman com colônias suspeitas de <i>S. aureus</i> .....	67

Ofereço a meu pai Stratos (*in memoriam*),  
À minha mãe Konstantina e  
à minha companheira Ana Leda

## Agradecimentos

Ao professor Harry Edmar Schulz, pela coragem em explorar novos campos de pesquisa e pela valorosa orientação fornecida durante a elaboração desse trabalho.

Ao professor Armando da Costa Manaia pelo incansável empenho no acompanhamento dos exames microbiológicos.

Aos professores Sérgio, Clóvis, Angela, Avani e Fábio; aos funcionários Zélia, Ivete, Cidinha, Beto e Tiago do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos pelo espaço cedido e o indispensável apoio para a execução desse trabalho.

Aos amigos do Projeto DBAA da Universidade Federal de São Carlos pela solubilização das amostras e pelos meios de cultura cedidos para a realização desse trabalho.

Ao jovem Ednilson Viana, pelas importantes considerações feitas durante a elaboração do projeto.

Às inigualáveis Sá, Pavi, Rose e Flávia pela habilidade em contornar problemas.

Aos amigos Alexandre, Lara, Xaruto, Gerson, Afonso, Peninha, Gica, Sendi, Sérgio, França, Robertinha, Jairão, Jairinho, Ana, Guilherme, Thaís, Xebolinha, Frank Jappa, Luis Bertolino pelos momentos de descontração.

À Cordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior CAPES, pela bolsa de auxílio à pesquisa concedida.

A todos os funcionários, colegas e professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP pela colaboração.

## Resumo

Kondogeorgos, D. E. (2000). Análise microbiológica de ração alternativa produzida a partir de resíduos alimentícios domiciliares. São Carlos, 2000. 85p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

O presente Trabalho foi realizado na cidade de São Carlos, onde cerca de 60% dos resíduos sólidos domiciliares são constituídos por matéria orgânica. Devido ao fato de ser formada por restos alimentares, uma fonte rica de nutrientes, essa fração orgânica pode ser utilizada na alimentação animal de forma geral. As etapas de reciclagem dos restos alimentares em ração animal envolveram a coleta seletiva em um bairro residencial da cidade, a trituração do material coletado, a autoclavagem, visando a eliminação de microrganismos e a posterior redução da umidade do produto obtido. Para que seja possível atestar a esterilidade comercial do produto as análises microbiológicas são indispensáveis. Entre os microrganismos analisados na ração obtida estão: *Bacillus cereus*; *Salmonella sp.*; *Staphylococcus aureus*; bem como a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem de enterobactérias totais viáveis, bolores, leveduras e contagem de *Escherichia coli*. Essas análises foram efetuadas com a utilização de meios de cultura seletivos, inibidores ou diferenciais, segundo métodos estabelecidos na literatura. Os resultados obtidos não comprometeram a utilização de resíduos sólidos domiciliares para a elaboração de ração alternativa do ponto de vista microbiológico, quando submetidos ao processo de esterilização.

Palavras- chave: Microbiologia; resíduos sólidos; reciclagem; ração.

## Abstract

Kondogeorgos, D. E. (2000). Microbiological analysis of alternative feed produced by the use of household food waste. São Carlos 2000. 85p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The present study took place in the city of São Carlos, where organic matter constitutes about 60% of house waste. Due to the fact that this organic fraction is composed of food remains, which is a rich source of nutrients, it can be used in feeding animals in general. Recycling food remains into animal feed involved: selective collection in a residential area of the city; grinding of collected material and the autoclaving, whose goal was the elimination of microorganisms and further reduction of the humidity obtained of the products. Microbiological analysis were indispensable to assert the commercial sterility of the product.

Among the microorganisms analysed in the obtained feed were: *Bacillus cereus*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* as well as the counting aerobic mesophylic microorganisms, totally viable enterobacteria moulds, yeasts and *Escherichia coli*. These analysis were made by means of the use of selective culture media, which were restraining or differential, according to methods established in the literature. The findings did not compromise the use of household solid waste to the manufacturing of alternative feed from a microbiological point-of-view when the waste was submitted to a sterilization process.

Keywords: Microbiology, Solid Waste, recycle, feed

## 1. Introdução

Resíduos sólidos são classificados, segundo a ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas (1987), como sendo os resíduos nos estados sólido e semi-sólido que resultam de atividades da comunidade de origem: industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnicas e economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível. De acordo com a mesma norma, os resíduos são classificados em três classes: classe I – perigosos; classe II – não-inertes; e classe III – inertes.

SCHALCH (1992) apresenta uma classificação dos resíduos sólidos na seguinte forma:

**Urbanos** – incluem o resíduo domiciliar, que é o lixo produzido nas residências; o comercial, que é aquele produzido em escritórios, lojas e hotéis, de varrição; e os resíduos de serviços, como por exemplo, feiras livres, capinação e poda;

**Industriais** – (tóxicos e perigosos) correspondem aos resíduos gerados pelos mais diversos tipos de indústrias de processamentos. Pertencem a uma área altamente complexa, pois, o resíduo, ou os resíduos, devem ser estudados caso a caso para que se tenha uma solução técnica adequada;

**Radioativos** – (lixo atômico) são resíduos provenientes do aproveitamento de combustíveis nucleares. Seu gerenciamento é de competência exclusiva da CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear;

**Agrícolas** – são resíduos que correspondem principalmente aos vasilhames descartados pelo uso de agrotóxicos;

**Resíduos de Serviços de Saúde** – São os resíduos produzidos em hospitais, clínicas médicas e veterinárias, farmácias e centros de saúde, entre outros.

Com o progressivo crescimento dos núcleos urbanos, a coleta, o transporte e a disposição final dos resíduos sólidos provenientes das inúmeras atividades humanas têm sido, cada vez mais, fonte de gastos para a limpeza pública.

No tratamento e disposição final, os resíduos urbanos são aqueles que mais oneram os cofres públicos. Além do aspecto financeiro, devem ser consideradas as conseqüências ambientais de ações inadequadas no manejo e disposição final de resíduos sólidos.

Quando considerada a exaustão e elevação dos custos da matéria prima, a economia de energia, a poluição e a indisponibilidade de áreas de aterro a reciclagem dos resíduos pode ser considerada uma necessidade. Entre os principais aspectos de relevância ambiental, social e econômica da reciclagem de resíduos sólidos, CALDERONI (1997) destaca:

- Melhor organização espacial
- Preservação dos recursos naturais
- Economia de energia
- Geração de empregos
- Desenvolvimento de produtos
- Saneamento básico / Saúde pública
- Geração de renda

Na caracterização dos resíduos sólidos urbanos, a matéria orgânica representa a parcela presente em maior quantidade (CASTRO, 1996 e SOBRAL, 1996). Entre as alternativas de tratamento desta fração dos resíduos há a compostagem e a produção de ração animal, ambos processos de reciclagem. Apesar de ser uma prática largamente utilizada, segundo LIMA (1991), existem várias restrições ao uso de rações elaboradas a partir de resíduos, entre elas, a ausência de uma metodologia

específica para efetuar as análises microbiológicas e a implementação de um programa de coleta seletiva eficiente.

Em outros setores geradores como a agroindústria muitos resíduos tendem a ser considerados como subprodutos. O termo subproduto caracteriza tudo aquilo que é obtido secundariamente de um produto principal. Independente dos problemas conceituais quanto aos termos resíduo e subproduto significarem materiais desejáveis ou não do ponto de vista econômico e ecológico, estes tendem a ser considerados cada vez mais componentes do processo produtivo, em decorrência dos volumes gerados, da crise energética mundial, da crescente preocupação com a redução da capacidade de suporte dos ecossistemas e dos efeitos planetários do mau uso dos recursos naturais (BUSCHINELLI, 1992).

BROCK *et. al.* (1996) afirmam que os animais podem contrair doenças contagiosas que podem ser transmitidas ao homem. Segundo PELCZAR (1980), em função do tratamento e armazenamento, os alimentos destinados à alimentação humana podem transmitir doenças de natureza infecciosa ou tóxica. Segundo HUGHES (2000) atualmente, as doenças infecciosas são a maior causa de morte ao redor do mundo. O autor ainda prevê uma explosão internacional de doenças relacionadas a alimentos devido a globalização do fornecimento de comida.

A portaria CVS-14, de 6 de março de 1990, (BRASIL, 1990) recomenda a cocção dos restos orgânicos provenientes de restaurantes, cozinhas industriais e assemelhados por 30 minutos, à temperatura não inferior a 100<sup>o</sup>C (Graus Celsius), antes de serem servidos aos animais (isso devido à prática corrente da alimentação desses com os referidos restos destes estabelecimentos).

No presente trabalho, com vista nas indicações encontradas na literatura, pretendeu-se avaliar a esterilidade de um composto alimentar processado à partir do lixo orgânico, cuja a finalidade é ser usado como ração animal. Os processos de avaliação da esterilidade seguiram os padrões vistos na literatura. Nesse sentido, destacamos a importância do presente trabalho para o estabelecimento de critérios que possam servir de base para opção pela reciclagem da matéria orgânica dos resíduos domiciliares em ração animal.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

A presente pesquisa foi inserida em um contexto que visa permitir a reciclagem da matéria orgânica do lixo em ração animal sem que isto coloque em risco a saúde pública.

### 2.2 Objetivos Específicos

Para a presente pesquisa, pretendeu-se:

- Atestar a esterilidade comercial do produto, obtido à partir do lixo tendo como parâmetro a ausência de microrganismos patogênicos bem como aqueles que possam causar intoxicação ou a deterioração do produto.
- Comparar a eficiência do processo de esterilização por autoclavagem com a redução da disponibilidade de água pela secagem em estufa com ventilação forçada.
- Comparar diferentes técnicas de quantificação de microrganismos existentes na literatura.

### 3. Revisão da Literatura

O crescente aumento da geração de resíduos mostra a urgente necessidade de reestruturação dos programas de tratamento e disposição final de resíduos no Brasil. Essas são propostas que estão de acordo com as intenções governamentais, a exemplo da Política Nacional e Estadual de Resíduos Sólidos, que enfatizam o gerenciamento integrado, através de articulações entre o poder público, produtores e demais segmentos da sociedade civil, com a responsabilização pós-consumo do produtor. A resolução 29 de 27 de abril de 1998, estabelece a graduação de metas ambientais, com o estabelecimento de metas a serem cumpridas: prevenir a geração, promover a minimização, a reutilização e a reciclagem dos resíduos sólidos no Brasil.

#### 3.1 Impactos ambientais da matéria orgânica dos resíduos

A matéria orgânica contida nos resíduos domiciliares é composta por uma mistura de resíduos como galhos, folhas, cascas de árvores provenientes de podas e capinação; bem como de restos de alimentos provenientes da cozinha das residências. A disposição inadequada dessa parcela de resíduos no meio ambiente tem graves conseqüências. Dos impactos ambientais gerados, dois devem ser destacados: a contaminação dos aquíferos pelo chorume e a disseminação de doenças por animais que freqüentam os locais de disposição final em busca de alimento.

Alguns aspectos epidemiológicos devem ser observados na interação homem-lixo. ANDRADE *apud* LADISLAU (1995) discrimina duas formas de contato indireto na relação homem-lixo: Pelo ar, água e solo; e por intermédio de vetores mecânicos ou biológicos, como artrópodos, roedores, suínos e aves. A veiculação de doenças por essas vias pode ser melhor analisada. ZANON & NEVES (1987) observam que a doença microbiana é de origem multifatorial cuja ocorrência depende, não somente da presença do agente etiológico, mas da reunião simultânea de :

- a) Um agente infeccioso em número ou virulência para iniciar o processo;
- b) Uma via de acesso para o hospedeiro;
- c) Uma porta de entrada no hospedeiro;
- d) Um hospedeiro em estado de suscetibilidade

Esta condição mostra uma estreita relação entre doença e o contexto social econômico cultural. Particularmente, as populações de baixa renda são as que mais estão expostas a essas condições, quer seja pela prática comum nas grandes cidades brasileiras de “catar” lixo, ou por habitar regiões no entorno dos locais de disposição final.

O chorume, segundo SCHALCH *opt. Cit.*, é originário do processo de decomposição predominantemente anaeróbia que ocorre nos lixões e aterros sanitários. A atividade microbiana tem como subproduto um líquido negro, ácido e mal cheiroso. VIANA (1999), observa que além dessa fração originária da atividade microbiana o chorume tem como outros componentes:

- a) Umidade natural do lixo
- b) Águas das chuvas
- c) Substâncias orgânicas e inorgânicas solúveis presentes no lixo, ou solubilizadas pela ação microbiana.

O chorume possui uma elevada carga orgânica e, como consequência, uma elevada taxa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Ao atingir os corpos d'água, essa alta taxa de DBO reduz o teor de oxigênio dissolvido disponível na água. Em média essa DBO chega a ser de 30 a 100 vezes maior que a do esgoto sanitário, que por sua vez oscila na faixa de 200 a 300 mg/L. Essa problemática não é exclusiva de lixões, tendo em vista que até mesmo aterros sanitários, que apesar de coletarem adequadamente esse resíduos, sofrem com sua disposição final. Parte desse chorume é recirculado para promover a decomposição da matéria orgânica do aterro.

Ao observarmos os problemas causados pela matéria orgânica, disposta corretamente ou não, percebermos que sua reciclagem tem um papel importante na solução desses problemas.

### 3.2 Reciclagem da matéria orgânica

Dos processos de reciclagem da matéria orgânica, o mais aplicado atualmente é a compostagem. KIEHL (1985) define compostagem como sendo um processo de transformação dos resíduos orgânicos em adubo humificado. Há duas fases distintas nesse processo: a digestão (ou decomposição) e a maturação, estágio mais longo onde a massa em fermentação atinge a humificação. Na fase inicial de decomposição da matéria orgânica, desenvolvem-se microrganismos que apresentam uma fermentação ácida, reduzindo assim o pH do composto, o que é favorável à formação de amônia. Na fase seguinte os ácidos são consumidos por outros agentes biológicos, elevando o pH. Os compostos completamente estabilizados apresentam pH geralmente entre 7,0 e 8,0. Em laboratório uma das melhores maneiras de avaliar a maturidade do composto é determinar a relação de carbono e nitrogênio (C/N). Uma relação igual ou inferior a 18/1 indica um composto semicurado, enquanto uma relação inferior a 12/1 indica um composto completamente curado.

O tempo necessário à compostagem da matéria orgânica, além de variar em função das condições ambientais, varia também de acordo com o tipo de compostagem empregado. Podemos distinguir dois processos de compostagem: o método natural em um pátio, formando leiras de compostagem, que pode levar de noventa a cento e vinte dias; e o método acelerado. O processo de compostagem é acelerado basicamente pela aeração do material submetido ao processo. Em usinas de triagem de resíduos, como por exemplo a Usina de Reciclagem e Compostagem de São Mateus, SP são utilizados equipamentos chamados bioestabilizadores. Este equipamento consiste de um cilindro metálico rotativo, com perfurações em toda sua extensão que gira em torno de 25 a 30 metros (CASTRO, 1996). Outro método acelerado consiste no uso de aeração forçada por tubulações perfuradas sobre as quais se colocam as pilhas de resíduos. (CEMPRE 1995). O composto, após a maturação, já pode ser utilizado como condicionador e fertilizante de solos.

Outro processo de tratamento de resíduos orgânicos citado por LIMA (1991) é a fabricação de ração animal ou “wastelage”, prática na Europa e EUA. PINEVICH & VERSILIN, *apud* LIMA (1991) propõem um método de fabricação que consiste de uma série de operações onde os resíduos são triturados, cozidos, secos e prensados.

VIANA (1999) avaliou a viabilidade da utilização de resíduos alimentícios como ingrediente para ração de frangos de corte. O trabalho foi executado em quatro etapas distintas:

- a) Coleta seletiva;
- b) Processamento;
- c) Caracterização e
- d) Avaliação de viabilidade nutricional

De acordo com a experimentação em frangos de corte realizada no trabalho, o produto obtido pode substituir em até 25% da ração comercial. Para que tal técnica, seja utilizada na prática, a coleta seletiva é um passo de fundamental importância. Esta só é possível quando há a participação efetiva da comunidade separando previamente os resíduos na fonte geradora.

### 3.3 Coleta Seletiva

EIGNHEER, (1998) descreveu algumas experiências de coleta seletiva em diversas cidades brasileiras. Em todos os casos, a participação efetiva da população tem particular destaque na triagem prévia, e conseqüentemente no êxito dos resultados. A comercialização dos recicláveis cobre normalmente parte dos custos dos programas; no entanto, a relação custo/benefício contempla outros aspectos: tais como ambientais, educativos, sociais e econômicos. O aumento da vida útil do aterro sanitário do município, como conseqüência da prática da reciclagem, por si já é um ganho ambiental considerável. Contudo a sensibilização da população para a questão

do desperdício e do impacto do lixo sobre o meio ambiente são ganhos reais e importantes que devem ser contabilizados, embora não se conheça metodologia que os mensure.

No presente trabalho tanto a coleta seletiva como o processamento do material coletado seguiu a metodologia desenvolvida por VIANA (1999).

Em seu trabalho VIANA escolheu 26 residências ao acaso no bairro Santa Felícia na cidade de São Carlos. A coleta seletiva realizada foi auxiliada por campanha feita através de folhetos explicativos e comunicação pessoal junto aos moradores dessas residências. Com a coleta realizada por aproximadamente 8 semanas, o autor obteve cerca de 30kg./dia com uma produção média por residência de 1,5kg/dia..

### 3.4 Processamento

A metodologia adotada por VIANA (1999) em sua avaliação da viabilidade nutricional dos resíduos alimentícios do lixo domiciliar como ingrediente para ração de frangos de corte foi a empregada no presente trabalho, e consiste das seguintes etapas:

#### a) Trituração do Material Coletado

A trituração da matéria orgânica teve por objetivo reduzir a granulometria e o volume da massa coletada, tornando-o um material homogêneo e adequado ao consumo dos frangos de corte, além de contribuir para o aumento da superfície de contato das partículas, tornando mais eficiente as etapas subsequentes: autoclavagem e secagem.

#### b) Esterilização em Autoclave

Como já foi mencionado, a portaria CVS-14, de 6 de março de 1990, (BRASIL, 1990) recomenda a cocção dos restos orgânicos provenientes de restaurantes, cozinhas industriais e assemelhados por 30 minutos, à temperatura não inferior a 100<sup>0</sup>C (Graus Celsius), antes de serem servidos aos animais

GERMER *et al.* (1995) observam que alimentos envasados são normalmente preservados por processos físicos ou químicos, sendo mais comum o emprego de tratamento térmico

A esterilização por processos térmicos depende do tamanho da população a ser esterilizada, bem como da condutividade térmica e transferência de calor no meio suporte. PELCZAR *op cit.* observa que, do ponto de vista microbiológico, esterilização significa a completa ausência de microrganismos. Porém, na indústria alimentícia existe o conceito de esterilidade comercial, associado às seguintes condições: ausência de microrganismos capazes de crescimento e deterioração do produto em condições normais de armazenamento; ausência de organismos patogênicos capazes de proliferar no alimento (GERMER, *et al.* 1995). De acordo

com COLLINS & LINE'S, (1995) os métodos de esterilização podem ser divididos em cinco processos básicos:

- Calor de chama (flambagem);
- Calor seco (ar quente);
- Vapor sob pressão (autoclavagem);
- Vapor sem pressão (tindalização);
- Filtração

#### c) Secagem sob Ventilação Forçada

Como veremos adiante a umidade, ou disponibilidade de água interfere de forma direta e decisiva na vida dos microrganismos. A redução de umidade dos alimentos é utilizada como técnica de conservação dos alimentos desde longa data. Esse procedimento será detalhadamente descrito em Materiais e Métodos.

### 3.5 Amostragem

Em se tratando de resíduos sólidos, para a Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT(1986) uma amostra representativa consiste de uma parcela do resíduo a ser estudado, que é obtida através de um processo de amostragem, que quando analisada, apresenta as mesmas características e propriedades da massa total do resíduo. Vale ressaltar que todos os aparatos utilizados na amostragem devem ser previamente esterilizados. Já na indústria alimentícia, HARRIGAN (1976) observa que os critérios para a amostragem devem contemplar o tipo de alimento e o processo de obtenção do mesmo. Alimentos em pó como farinhas e leite desidratado misturam-se o suficiente para permitir uma amostra única e razoavelmente pequena. O processo de amostragem recomendado pela ABNT para resíduos sólidos é o quarteamento, que consiste na divisão de uma amostra em quatro partes iguais, sendo tomadas duas partes opostas entre si para constituir uma nova amostra e descartadas as restantes. As partes não descartadas são misturadas e o processo é repetido até se obter o volume desejado.

### 3.6 Solubilização

Para definir a melhor forma de solubilização das amostras a serem investigadas, levando em conta os objetivos do trabalho, foi realizado um levantamento, não somente das metodologias diretamente relacionadas, como também as das áreas afins, como por exemplo na área de alimentos. A AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1984) e a portaria nº 01 de 28 de janeiro de 1987 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária, BRASIL (1987) recomendam que 25 gramas de amostra devem ser solubilizadas em 225ml de água destilada para posterior análise. HARRIGAN (1976) propõe a reidratação de dez gramas de leite em pó em noventa ml de água destilada. Por outro lado, a ABNT na norma técnica NBR 10006 (BRASIL 1999) adota a solubilização de 250 gramas de resíduo em um litro de água destilada. A norma propõe ainda a filtração da amostra em aparelho munido de membrana filtrante de 0,45µm de porosidade. De acordo com a Portaria nº 8 publicada em 04 de setembro de 1991, do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1991), deve-se pesar 25gramas de amostra homogeneizada e adicionar 225 ml de água peptonada a 1%.

### 3.7 Aspectos Técnicos e Legais do Exame Microbiológico de Rações

Embora a prática de utilizar os resíduos da alimentação humana na alimentação de animais de criação seja uma prática que acompanha o homem desde o início de sua história, a aplicação desse procedimento em larga escala é revestido de um série de dúvidas: conceituais, como diferenciar um resíduo de um subproduto; ou de ordem prática, como examinar microbiologicamente essa ração. A ausência de análises físico-químicas e microbiológicas, que permitem atestar a qualidade real da ração, pode comprometer o uso dessas rações.

Segundo PELCZAR (1986) os tecidos de animais e vegetais saudáveis são livres de microrganismos. Porém, a superfície desses organismos bem como a de alguns órgãos e tecidos em animais como o intestino, boca, faringe, pele entre outros são contaminados por uma microbiota.

Quando tratamos de alimentos, a magnitude de contaminação dos resíduos alimentícios depende dos seguintes fatores:

- a) Da população microbiana existente no ambiente onde os alimentos foram coletados;
- b) As condições dos alimentos crus;
- c) O método de manipulação e
- d) O tempo e condições de armazenamento.

No que se refere às análises microbiológicas, diversos microrganismos são de particular interesse para a sanidade animal e humana. SCHWARTZ (1974), em seu manual de sanidade avícola, lista diversas enfermidades bacterianas nas quais a via de contaminação pode ser o alimento. Entre elas: salmoneloses, erisipela, estafilococoses, botulismo e infecções intestinais. BROCK *et.al.* (1994) destacam duas categorias de doenças de origem alimentar no homem: intoxicação por alimentos contaminados; e a infecção alimentar, provocada pelo desenvolvimento de microrganismos patogênicos contidos em alimentos contaminados.

Entre os organismos causadores de intoxicação alimentar estão: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. As bactérias *Escherichia coli* patogênicas, *Shigella* e *Campylobacter jejuni* podem causar infecções que estão intimamente ligadas à carne de aves domésticas contaminadas (PELCZAR 1986).

COLLINS (1995) discrimina agentes, sintomas, e prováveis alimentos responsáveis pelo intoxicação alimentar (figura 3.7)

Tabela 3.7 Agentes, sintomas, e prováveis alimentos responsáveis pela intoxicação e infecção alimentar

Período de incubação	Organismo	Vômito	Diarréia	Cólica	Febre	Duração	Exemplo de alimentos
30min. - 4h	<i>B. cereus</i> (emético)	+++	(+)	(+)	-	Curta	Arroz
4 - 6h	<i>S. aureus</i>	++	+	++	-	6 - 12h	Carne resfriada, laticínios, ovos, saladas
8 - 22h	<i>C. perfringens</i>	-	++	++	-	12 - 24h	Enlatados
8 - 48h	<i>V. parahemolyticus</i>	-	+++	-	+	2 - 3 dias	Carne, frutos do mar
8 - 12h	<i>B. cereus</i>	-	++	++	-	1 - 2 dias	Sopas, laticínios
8 - 48h	<i>Salmonella</i>	(+)	++	-	+	48h - 7 dias	Ovos de pata e galinha, carne e frango
24 - 72h	<i>C. botulinum</i>	-	-	-	- <sup>A</sup>	3 dias	Enlatados, carne, peixe
2 - 11 dias	<i>Camylobacter</i>	-	+++	++	++	3 dias - 3 sem.	Leite, água, carne e peixe cru, cogumelos

+ Ocorre

(+) pode ou não ocorrer -<sup>A</sup> distúrbios do SNC

- Não ocorre

Zoonoses são doenças que normalmente acometem animais e a manutenção do agente etiológico na natureza depende da transmissão de animal para animal, porém essas zoonoses podem eventualmente acometer o ser humano. (BROCK, 1994).

Na prevenção das zoonoses, os processos de esterilização e de preservação são de particular interesse. De acordo com a Portaria nº 8 publicada em 04 de setembro de 1991, do ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1991), os métodos microbiológicos aprovados para produtos e subprodutos de origem animal, rações e concentrados, incluem contagem de bolores e leveduras, contagem de *E. coli*, contagem de coliformes totais viáveis e pesquisa de *Salmonella*. Além desses microrganismos *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* também são alvo de investigação. Não existem limites definidos pela portaria citada, porém, a referência adotada pelo presente trabalho consta da portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997 do Ministério da Saúde publicada em 2 de julho de 1998, que consta dos anexos desse trabalho. A portaria nº 451 regulamenta os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para a análise de alimentos destinados ao consumo humano.

O número de microrganismos indica a qualidade microbiológica do alimento. Um número elevado sugere baixa qualidade dos alimentos e eventual presença de organismos patogênicos. CLAUS (1989).

O número de microrganismos presentes é um bom indicador de como os alimentos foram manuseados e armazenados.

BROCK *op. cit* afirmam que quanto à perecibilidade os alimentos podem ser divididos em três categorias: alimentos altamente perecíveis, como carnes, peixes, aves domésticas, ovos, leite e a maioria das frutas e verduras; alimentos semi-perecíveis como tubérculos, maçãs e nozes; e alimentos estáveis, como açúcar e grãos.

Para melhor compreendermos a importância do tratamento térmico na industrialização de alimentos, quer para o homem ou para a nutrição animal, é preciso conhecer algumas variáveis ambientais que influenciam o desenvolvimento microbiano.

Entre as condições ambientais que mais influenciam o desenvolvimento dos microrganismos, além da disponibilidade de nutrientes estão a temperatura, a disponibilidade de água e concentração hidrogeniônica ou pH. BROCK *et al.* (1994); BURNETT *et al.* (1978) e PELCZAR *et al.* (1986).

Um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de comunidades microbianas, sem dúvida, é a temperatura. A temperatura atua sobre a atividade enzimática dos seres vivos, havendo, de acordo com a taxa de crescimento populacional, três faixas de temperatura distintas: temperatura mínima, onde o crescimento populacional é baixo; temperatura ótima, onde o crescimento é mais rápido; e por fim a temperatura máxima, onde o crescimento não é mais possível. De acordo com a faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento dos microrganismos podemos distinguir quatro grupos distintos: psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos BROCK *et al.* (1994).

BROCK *opt. cit.* Define a disponibilidade de água como um dos mais importantes fatores que afetam o desenvolvimento microbiano em ambientes naturais. A disponibilidade de água não depende somente da água contida no ambiente, pois substâncias sólidas ou superfícies tem a capacidade de absorver moléculas de água tornando-as indisponíveis aos microrganismos. Solutos como sais ou açúcares são solúveis em água. A água associada a esses solutos torna-se também indisponível aos microrganismos. A disponibilidade de água pode ser expressa em termos físicos como atividade de água ou potencial de água. Na microbiologia de alimentos, onde a disponibilidade de água é de particular interesse, Atividade de água (Aa) é definida como sendo a taxa da pressão de vapor do ar em equilíbrio com a substância ou solução, dividida pela pressão de vapor da água pura à mesma temperatura. A disponibilidade de água afeta diretamente o crescimento microbiano. Embora a maioria dos microrganismos não apresentem evoluções em baixas atividades de água, deve haver reservas no que diz respeito a formas de resistência como esporos.

Quanto ao potencial hidrogeniônico, a faixa ótima de desenvolvimento varia de 5.0 a 9.0 para maioria dos microrganismos, apesar de existirem organismos que podem crescer abaixo do Ph 2.0 ou acima de 10.0 (BROCK *et al.* 1994).

A avaliação da eficiência dos agentes esterilizadores, como o calor, pode ser executado com o emprego de bioindicadores. Para BURNETT op. cit. tal método não é fidedigno, pois esses indicadores não mostram o tempo de exposição à temperatura necessária ou contato com o vapor. Uma outra possibilidade para a avaliação da eficiência na esterilização seria o exame e a identificação dos microrganismos presentes na amostra após o processamento do material.

Entre os aspectos de importância do microbiólogo na indústria alimentícia, HARRIGAN (1976) destaca: o controle da qualidade da matéria prima que chega à indústria, treinamento de higiene da equipe de produção, avaliação da eficiência de desinfetantes e detergentes, estabelecimento de procedimentos de limpeza, o exame de amostras de produtos finais, bem como a investigação das queixas feitas pelos clientes. A atuação do programa de controle de qualidade dos alimentos, de acordo com o autor, deve atuar em três níveis: controle higiênico do processo, detecção dos possíveis riscos à saúde pública provenientes da presença de microrganismos patogênicos no produto e a avaliação do potencial prazo de validade ou estocagem do produto. Os métodos de exame de qualidade microbiológica dos alimentos são destrutivos. Por consequência, é impossível adotar uma política de tolerância zero de microrganismos em uma indústria alimentícia .

Sendo assim, a amostragem para a análise ganha particular destaque no controle da qualidade dos alimentos.

### 3.8 Exame Microbiológico

A identificação de microrganismos causadores de doenças é conhecida como microbiologia clínica. Os laboratórios clínicos são capazes de isolar, identificar e determinar a sensibilidade dos microrganismos a diferentes antibióticos em poucos dias. Avanços recentes no diagnóstico de doenças podem reduzir esse tempo a algumas horas quando são utilizados métodos imunológicos. Já os métodos tradicionais baseiam-se no crescimento de uma colônia de microrganismos. O

crescimento de uma determinada espécie de microrganismos pode ser privilegiado ou até mesmo inibido em função do meio de cultura empregado.

Para que seja possível determinar o meio de cultura mais adequado à identificação dos microrganismos de nosso interesse é necessário tecer algumas considerações sobre as exigências nutricionais dos microrganismos de modo geral. BURNETT opt.cit., destaca como fatores exigidos: doadores e aceptores de hidrogênio, uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, sais minerais, vitaminas, elementos traço e fatores de crescimento. Aceptores de hidrogênio são também exigidos pelas bactérias para realizar reações de oxirredução. As bactérias aeróbias exigem o oxigênio comoceptor de hidrogênio, enquanto as anaeróbias, que não podem utilizar o oxigênio, empregam compostos orgânicos ou substâncias inorgânicas, tais como sulfatos, nitritos, nitratos ou carbonatos. Muitas bactérias exigem uma fonte de nitrogênio mais complexa. Essa fonte pode ser inorgânica para os organismos quimioautótrofos; ou orgânica para os heterótrofos.

BARON (1990) cita quatro tipos de meios de cultura aplicados nos diagnósticos clínicos: Meios Enriquecidos, possuem nutrientes que estimulam o crescimento de certos organismos entre outros da flora normal; Meios não seletivos, contém nutrientes que permitem o crescimento de organismos não fastidiosos até sua taxa de crescimento natural sem que nenhum organismo em particular tenha vantagem de crescimento; Meios Seletivos, aqueles que contém um ou mais agentes inibidores e ainda incorporando componentes que tenham importante papel na atividade metabólica dos organismos procurados; Meios Diferenciais, utilizam substâncias que permitam distinguir colônias de organismos que possuam certos metabólitos ou características da cultura que possam ser distinguidas morfologicamente. Esses meios podem ser utilizados na identificação de eventuais patógenos presentes em alimentos e rações.

### 3.8.1 Contagem de mesófilos aeróbios totais

O número de microrganismos indica a qualidade microbiológica do alimento. Um número elevado sugere baixa qualidade dos alimentos e eventual presença de

organismos patogênicos. A presença de um elevado número de microrganismos não significa que o alimento esteja deteriorado, porém também não sugere que o produto tenha passado por um processo sanitário adequado. CLAUS (1989)

### 3.8.2 Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores, leveduras é uma medida de crescimento microbiológico. A técnica de contagem em placas é baseada no princípio de que cada organismo viável formará uma colônia. Além da possibilidade de originar doenças, os bolores e leveduras alteram a cor, sabor e textura dos alimentos.

Existem três mecanismos de selecionar os bolores e leveduras: redução do pH do meio utilizado, adição de antibióticos ao meio e a temperatura de incubação, controlando assim o crescimento de bactérias HARRIGAN (1976).

### 3.8.3 Contagem de coliformes totais, fecais e pesquisa de *E. coli*

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são bastonetes gram negativos não esporulantes que fermentam glicose com ou sem produção de gás. São oxidase negativas e quase todas são capazes de reduzir nitrato a nitrito (HOLT & KRIEG, 1984). Os gêneros *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *enterobacter* são, por razões históricas conhecidos como coliformes. Destes gêneros, *Escherichia* e *Klebsiella* são conhecidos como coliformes *fecais* ou termotolerantes. (COLLINS 1995). Embora algumas espécies de *Klebsiella* possam causar doenças no ser humano, a maioria dos representantes do grupo são encontrados na água e no solo. Já as espécies de *escherichia* são habitantes praticamente universais no trato digestivo humano e em animais de sangue quente (BROCK *et al.*1994). As espécies de *escherichia* quando associadas a outras infecções em humanos podem causar

infecções urinárias e em animais podem provocar mastites. Os tipos de *E. coli* patogênicos são agrupados em: enteropatogênicos, enterotoxigênicos, enteroinvasivos e enterohemorrágicos.

#### 3.8.4 Pesquisa de *Salmonella*

A pesquisa clínica e em alimentos desse grupo é particularmente dificultada pelo grande número de espécies existentes. São bactérias gram negativas, anaeróbias facultativas, com motilidade e catalase positivas. Produzem gás a partir de glicose e poucas espécies fermentam lactose, sendo que o citrato é utilizado como fonte de carbono. Patogênica para humanos, provoca febres intestinais, gastroenterites e septicemia. (HOLT & KRIEG, 1984). As mais de mil e setecentas “espécies” ou sorotipos existentes podem ser divididos em quarenta grupos de acordo com fatores de identificação antigênica. Para o isolamento e identificação do gênero *salmonella* os meios seletivos divididos conforme sua seletividade:

Categoria I: meios de alto poder de seleção, como o agar desoxicolato citrato, agar *Salmonella shigella* e o agar bismuto sulfito.

Categoria II meios com baixo poder de seleção, como agar verde brilhante, agar MacConkey e caldo tetracionato.

A confirmação da presença de *Salmonella* é antigênica, feita com o uso de soro polivalente.

Um meio que pode ser utilizado na pesquisa de *Salmonella* é o PESSOA & SILVA. Esse meio contém os testes de produção de gás por fermentação de glicose, produção de H<sub>2</sub>S, hidrólise da uréia e desaminação do triptofano, bem como motilidade, produção de indol e descarboxilação de lisina. Esse meio permite a identificação presuntiva de gêneros da família *Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, e *Y. enterocolitica* (PESSOA & SILVA, 1974).

### 3.8.5 Enumeração de *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram positivos da família Micrococcaceae. Dividem-se em planos diferentes e quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cacho de uva. São facultativas anaeróbias com maior crescimento sob condições aeróbias, quando então produzem catalase. Das 19 espécies do gênero, a *S. aureus* é sem dúvida a mais importante em se tratando de alimentos. Com exceção de *S. chromogens*, as demais espécies apresentam resultados positivos para o teste da coagulase com plasma de coelho e termonuclease (Tnase).

*S. aureus* causa intoxicação alimentar, que é provocada por diversas toxinas diferentes produzidas por essa bactéria. O homem e os animais são o principal reservatório desse patógeno na natureza. Os portadores nasais e os manipuladores de alimentos são as principais fontes de contaminação do alimento (FRANCO, 1996).

### 3.8.6 Enumeração de *B. cereus*

As bactérias do gênero *Bacillus* tem como característica uma intensa atividade metabólica. Produzem uma grande variedade de enzimas que degradam diferentes substratos. Esse fato de certo modo complica a classificação desses microrganismos. Os *B. cereus* são gram positivos, aeróbios, mesófilos, com motilidade e produtores de esporos. Hidrolizam amido, caseína e gelatina. São catalase positivos e oxidase variável. A temperatura ótima para seu crescimento fica entre 28°C e 35°C pH entre 3,9 e 9,3.(SNEATH & MAIR, 1986)

O *b.cereus* pode originar duas formas distintas de gastroenterites: Eméticas, que tem período de incubação curto, pode durar até 24 horas e está quase que exclusivamente associada a alimentos farináceos contendo cereais; e a síndrome diarreica, que tem período de incubação de 8 a 16 horas, dura de 12 a 24 horas e que tem como principais sintomas forte diarreia e dores abdominais. (FRANCO, 1996).

## 4. Material e Métodos

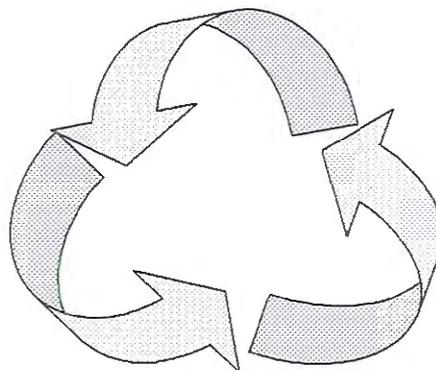
### 4.1 Coleta Seletiva

Nessa etapa, para a obtenção da ração animal a partir dos resíduos orgânicos domiciliares, foi utilizado o mesmo método de coleta seletiva utilizado por VIANA, (1999), porém com número de residências participantes e período de coleta reduzido. O pesquisador optou pelo bairro de Santa Felícia da cidade de São Carlos por ser este um bairro residencial razoavelmente próximo ao *campus* da USP, de fácil acesso e por ser constituído por uma classe econômica de baixa renda, o que sugere uma maior porcentagem de resíduos alimentares.

O número de residências participantes, que inicialmente era de vinte e seis foi reduzido para dez. Essas residências foram selecionadas entre as que já haviam participado do programa de coleta seletiva promovido por VIANA (1999). A rua Manoel P. Ferreira foi escolhida entre as três que participaram da referida coleta por permitir um roteiro de coleta mais rápido e de percurso mais curto, reduzindo dessa forma os custos da operação. A coleta foi efetuada utilizando veículo cedido pelo setor de Transportes da Prefeitura Universitária.

As residências foram escolhidas devido ao fato de já terem participado de um programa de coleta seletiva semelhante, estando portanto familiarizadas com a segregação dos resíduos. Após a escolha das residências foi feito um primeiro contato com a população. Nesse contato foi feita a identificação da instituição envolvida no trabalho, destacando-se os objetivos do trabalho, sua importância ambiental e a forma adequada de segregação dos resíduos orgânicos. Essas informações foram impressas em um folheto explicativo (figura 4.1). O horário de coleta foi definido em comum acordo pela população para as 8:00 horas.

# Coleta seletiva



SEPARE O LIXO  
PRESERVE O MEIO AMBIENTE

## COLETA SELETIVA NO BAIRRO SANTA FELÍCIA

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E  
SANEAMENTO  
USP

**Figura 4.1** Folha de rosto do folheto explicativo distribuído à população do bairro Santa Felícia



Figura4.1 (continuação) Conteúdo do folheto explicativo

Na tabela 4.1 estão discriminadas as residências participantes, o número de pessoas de cada residência bem como o nome da pessoa responsável pela entrega do material segregado. Para evitar qualquer ônus sobre os munícipes foram fornecidas lixeiras basculantes, bem como sacos de lixo com capacidade de 20 litros para os participantes. Nessa fase dos trabalhos, convém destacar a franca colaboração da comunidade envolvida, assim como a notável credibilidade desta para com nossa instituição.

Os resíduos orgânicos, foram coletados diariamente por um período de 10 dias: de 28 de julho a 6 de agosto de 1998.

Tabela 4.1 – Dados sobre a população do bairro Santa Felícia voluntária para o programa de coleta seletiva.

<b>Nº da residência</b>	<b>endereço</b>	<b>Pessoas por residência</b>	<b>Nome do responsável</b>
1	Rua Manoel P. Ferreira, 65	4	Hilário
2	Rua Manoel P. Ferreira, 75	4	Zelão
3	Rua Manoel P. Ferreira, 80	2	Wilson
4	Rua Manoel P. Ferreira, 85	4	Osvaldo
5	Rua Manoel P. Ferreira, 90	4	Joaquim
6	Rua Manoel P. Ferreira, 95	4	Cida
7	Rua Manoel P. Ferreira, 100	3	Clarice
8	Rua Manoel P. Ferreira, 110	4	Zilda
9	Rua Manoel P. Ferreira, 115	7	Irene
10	Rua Manoel P. Ferreira, 140	4	Sônia

## 4.2 Processamento do Material Coletado

O processamento do material obtido na coleta seletiva foi realizado no Laboratório de Resíduos Sólidos do Departamento de Hidráulica e Saneamento, *campus* da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. As etapas de processamento estão descritas a seguir. Convém destacar que foram dados dois tratamentos distintos aos resíduos triturados: parte foi autoclavada e parte não.

### 4.2.1 Escolha de Utensílios e Equipamentos

A Escolha dos equipamentos e utensílios utilizados no trabalho foi fundamentada na adequação às condições impostas no processamento dos resíduos. Triturador, estufa de ventilação forçada e autoclave devem ter dimensões que permitam processar o material coletado no dia.

O recipiente utilizado na autoclavagem dos resíduos deve ser resistente à temperatura e pressão elevadas, ser inerte e aproveitar ao máximo o volume interno do equipamento. No presente trabalho foi utilizado um tambor de aço inoxidável de uso odontológico.

Da mesma forma, as bandejas, que serviram tanto para coleta do material do triturador como para a secagem em estufa devem:

- a) Ocupar de forma ótima as grades do equipamento
- b) Resistir à temperatura estabelecida de 60<sup>o</sup>C

### 4.2.2 Trituração

A trituração da matéria orgânica teve por objetivo reduzir a granulometria e o volume da massa coletada, tornando-a um material relativamente homogêneo, aumentando a superfície de contato com o ar, favorecendo assim a autoclavagem e secagem. O equipamento utilizado nessa etapa foi o triturador forrageiro do tipo JF 2, marca JF Nogueira, com quatro tipos de peneiras ( 0.8, 3.5, 5 e 10 mm). A peneira empregada na trituração foi a de 5 mm de espessura.

Os resíduos coletados foram dispostos junto ao triturador, que fica nas dependências do Laboratório de Resíduos Sólidos. Após o transporte dos resíduos o triturador era preparado para entrar em funcionamento (colocação da peneira, preparação das bandejas coletoras e uso dos equipamentos de segurança).

Nesse momento os sacos plásticos foram abertos para uma caracterização prévia dos resíduos em busca de ossos grandes, tampas metálicas ou qualquer outro objeto que pudesse danificar o equipamento ou oferecer risco à operação. A operação consistiu em colocar os resíduos pelo coletor de admissão do triturador. O coletor levava a uma câmara interna onde facas giratórias trituraram o material até que este tivesse sua granulometria reduzida ao ponto de passar pela peneira de 5 mm. Nesse ponto, os resíduos já triturados caíam, através de um coletor de escape, nas bandejas de secagem. O alto teor de umidade dos resíduos triturados ocasionou a aderência de grande quantidade de material no equipamento após a operação. Após terminada a operação esses resíduos foram retirados do interior do aparelho e este foi cuidadosamente limpo, utilizando água e detergente buscando evitar assim a contaminação por fungos ou bactérias do material a ser processado no dia subsequente. Esse foi um processo repetido diariamente no período da coleta. O material, após o processamento, foi homogeneizado e submetido aos diferentes tratamentos.

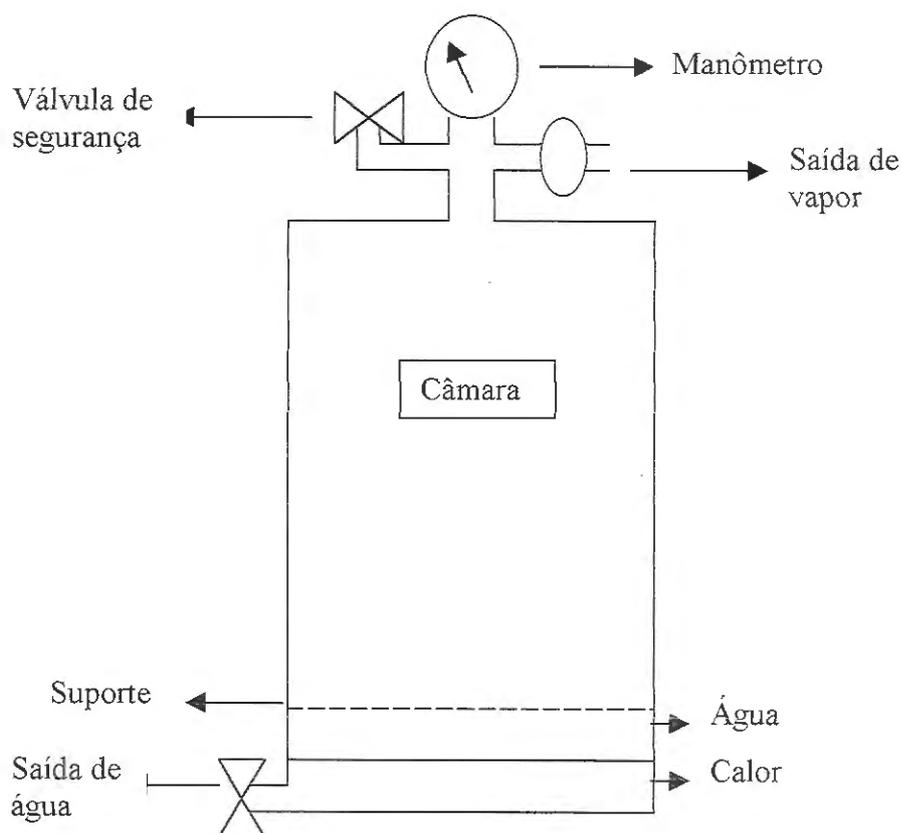
Vale destacar que a trituração, além de aumentar a área de contato do material com o vapor durante o período de tratamento térmico, pode ocasionar uma melhor digestibilidade por parte dos frangos alimentados com a mesma.

#### 4.2.3 Tratamento Térmico

A esterilização pelo tratamento térmico foi executada em uma autoclave de 45 litros marca Phenix. Essa esterilização foi feita à temperatura de 121<sup>0</sup>C por 15 minutos sob uma pressão de 1,1 atmosferas.

Para efeito de comparação, o material triturado relativo à primeira semana de coleta não foi autoclavado. O exame microbiológico foi efetuado na razão inicial, não autoclavada e na final, autoclavada.

Os resíduos triturados eram colocados no tambor de aço inoxidável e levados à câmara da autoclave (figura 4.2.3). Já com o material no aparelho devidamente fechado, com a válvula de segurança aberta este tinha sua chave geral ligada na posição máximo. Quando a temperatura atingia  $121^{\circ}\text{C}$ , com saída de vapor fluente pela válvula de segurança a chave geral era colocada no mínimo, a válvula fechada e eram cronometrados 15 minutos. Após esse período, o aparelho era desligado. Após o resfriamento e a redução da pressão interna, o aparelho era aberto e o material esterilizado acondicionado nas bandejas de secagem, para serem então encaminhados para a estufa de ventilação forçada. Para realizar essa operação é indispensável o uso de luvas de raspa de couro. Em função do volume de resíduos coletados no dia essa operação podia ser repetida. Quando o volume ultrapassava os 10 kg era dividido para ser autoclavado em duas etapas. Cada operação durava em torno de duas horas.



**Figura 4.2.3** Esquema geral de autoclave

#### 4.2.4 Desidratação em estufa a 60<sup>0</sup>C com ventilação forçada

A desidratação da massa orgânica, realizada após a autoclavagem, consiste na redução da umidade até 12% por meio de estufa secadora e esterilizadora modelo 320 SE marca FANEM. O espaço interno de 60 cm de profundidade, 50 cm de largura e 50 cm de altura permitiu acomodar adequadamente quatro bandejas de 50cm x 40cm x10cm com a massa de resíduos coletada em cada dia. Uma vez etiquetadas com a data de coleta e tipo de tratamento térmico, essas bandejas eram levadas à estufa de ventilação forçada sob uma temperatura de 60<sup>0</sup>C por 24 horas, com revolvimento constante desse material. Após esse período, o material era retirado da estufa e novamente triturado com o emprego da peneira de 3mm, desagregando assim os aglomerados formados durante a secagem, obtendo-se uma granulometria desejada na alimentação de aves.

Ao final de cada semana de coleta, de acordo com o tipo de tratamento térmico, o material seco foi homogeneizado, embalado em sacos plásticos leitosos de 60cm x 40cm, etiquetado e acondicionado em local seco. Esses sacos são feitos com matéria prima virgem mas não sofrem nenhum tratamento para redução da eventual carga bacteriana.

A redução da umidade atua como fator limitante ao desenvolvimento de microrganismos. O cálculo da umidade foi baseado na metodologia descrita no STANDARD METHODS, 1992, como se segue.

- Pesa-se uma capsula de porcelana ( $P_0$ )
- Pesa-se uma capsula com o material ( $P_1$ )
- Leva-se à estufa a uma temperatura de 104<sup>0</sup>C por 24 horas
- Pesa-se o conjunto material mais cápsula depois de 24 horas ( $P_2$ )
- Faz-se o cálculo da umidade através da obtenção do peso úmido =  $P_1 - P_0$ , do peso seco =  $P_2 - P_0$ , então temos: % de umidade =  $1 - \text{peso seco} / \text{peso úmido}$ .

### 4.3 Exame Microbiológico

Como foi colocado anteriormente, o presente trabalho teve por objetivo, comparar a eficiência do processo térmico na esterilização da ração por autoclavagem, com uma ração não autoclavada, assim como, comparar diferentes técnicas de contagem de microrganismos.

Entre os meios de cultura de uso geral, para uma primeira semeadura a água peptonada é de aplicação bastante ampla, sendo satisfatórios para muitos tipos de microrganismos. Tendo em vista uma posterior inoculação em meios seletivos, para identificação e contagem dos diversos microrganismos mencionados, a opção por um meio líquido para a incubação das amostras mostra-se mais adequado. Vale destacar que todos os procedimentos a seguir foram realizados em duplicata para cada tipo de ração. As etapas dos exames, quando necessárias, foram realizados em câmara asséptica, como a figura 4.3 destaca.



**Figura 4.3 Sala asséptica**

#### 4.3.1 Amostragem

Para proceder a amostragem, o material foi colocado em bandejas plásticas grandes onde foi homogeneizado. O método de amostragem foi o o quarteamento, recomendado pela ABNT. A parcela final obtida tornou-se então nossa amostra. A medida que os exames eram realizados, parte dessa amostra primária obtida no quarteamento era utilizada. Vale lembrar que os utensílios usados na amostragem foram devidamente descontaminados, com a utilização de algodão estéril e álcool. Para cada tratamento térmico realizado obteve-se uma amostra primária. Essas parcelas foram embaladas em sacos plásticos, rotuladas e guardadas em armário até o momento de realização das análises

#### 4.3.2 Solubilização e diluição das amostras

Para a solubilização da ração foi seguido o método recomendado pela portaria 108 da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, que por sua vez está de acordo com STANDARDS METHODS FOR EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS (1972). Em um primeiro passo, pesou-se 25g de ração representativos da amostra. Acrescenta-se 225 ml de água destilada estéril obtendo assim a diluição  $10^{-1}$ . A homogeneização deve se iniciar lentamente e passar para alta velocidade após 1 minuto. O tempo total de homogeneização é de 2 horas. Após a homogeneização, feita em agitador magnético, preparou-se as diluições em tubo de ensaio (16x160mm) de 1ml do homogeneizado em 9ml de água peptonada com pH em torno de 7,0 obtendo assim a diluição  $10^{-2}$ . Essa diluição seriada foi realizada até a concentração de  $10^{-6}$ . Essas diluições decimais seriadas foram empregadas em todos os exames executados. Quando a amostra a ser diluída é sólida ou semi-sólida a solubilização inicial representa a diluição 1:10, isto é, 1 ml de solução contém 0,1g da amostra original. As diluições representadas na tabela 4.3.2.

Tabela 4.3.2 diluição de amostras sólidas

Tubo	1	2	3	4
Diluição	1:100	1:1000	1:10.000	1:100.000
Quantidade de amostra original (g) /ml	0,01 ou $10^{-2}$	0,001 ou $10^{-3}$	0,0001 ou $10^{-4}$	0,00001 ou $10^{-5}$

#### 4.3.3 Contagem padrão de mesófilos aeróbios totais viáveis

Das diluições seriadas decimais foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e semeadas com o auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri, contendo o meio de ágar padrão, de acordo com a APHA 1976. As placas assim semeadas foram incubadas a 28°C por um período de 48 horas. A semeadura em placas referentes a cada diluição foi feita em duplicata. Para o cálculo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), multiplicou-se o número médio de colônias das placas de mesma diluição, pela diluição da amostra das placas. Os resultados são expressos em UFC/ml.

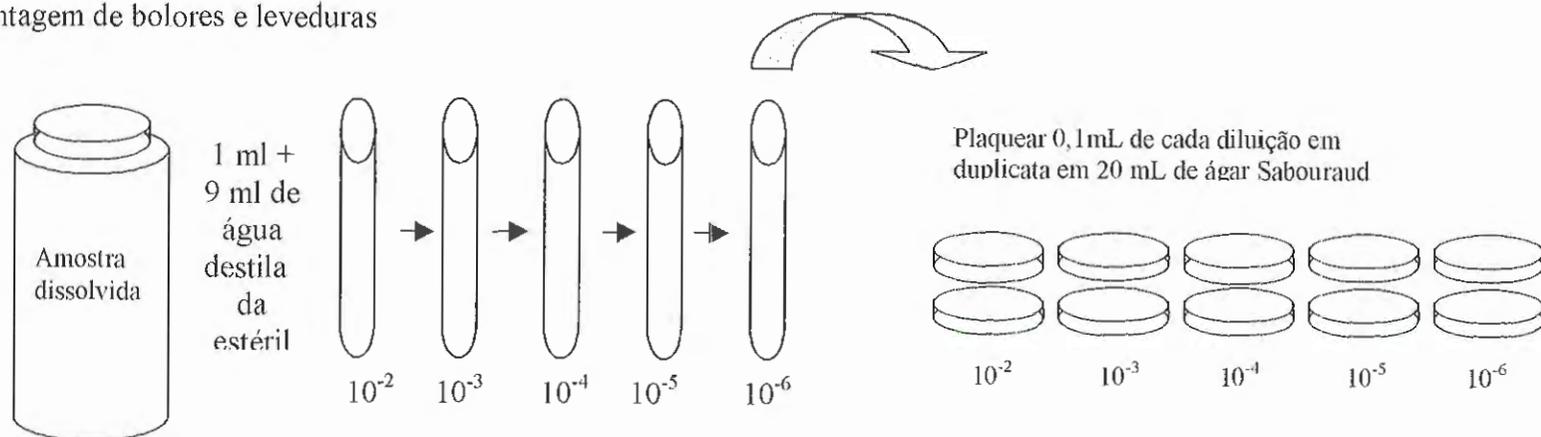
#### 4.3.4 Contagem de Bolores e Leveduras

Nesse processo, 0,1 ml da suspensão foi semeado em 20ml de meio nutritivo fundido. As amostra de diferentes concentrações foram plaqueadas em duplicata. A contagem propriamente dita foi feita com o auxílio de um contador de colônias bacterianas. O resultado expressa a média da soma do número de colônias das duas placas.

Os fungos filamentosos, bem como as leveduras desenvolvem-se melhor em pH ácido, sendo este um fator limitante ao desenvolvimento da maioria das bactérias. O meio indicado para este método é o agar Sabouraud semeado superficialmente

com o auxílio da alça de Drigalski. Após a inoculação com as diluições apropriadas as placas foram encubadas a 28°C durante 2 dias. O procedimento pode ser visto na figura 4.3.3.

## Contagem de bolores e leveduras



## Contagem padrão de mesófilos aeróbios totais viáveis

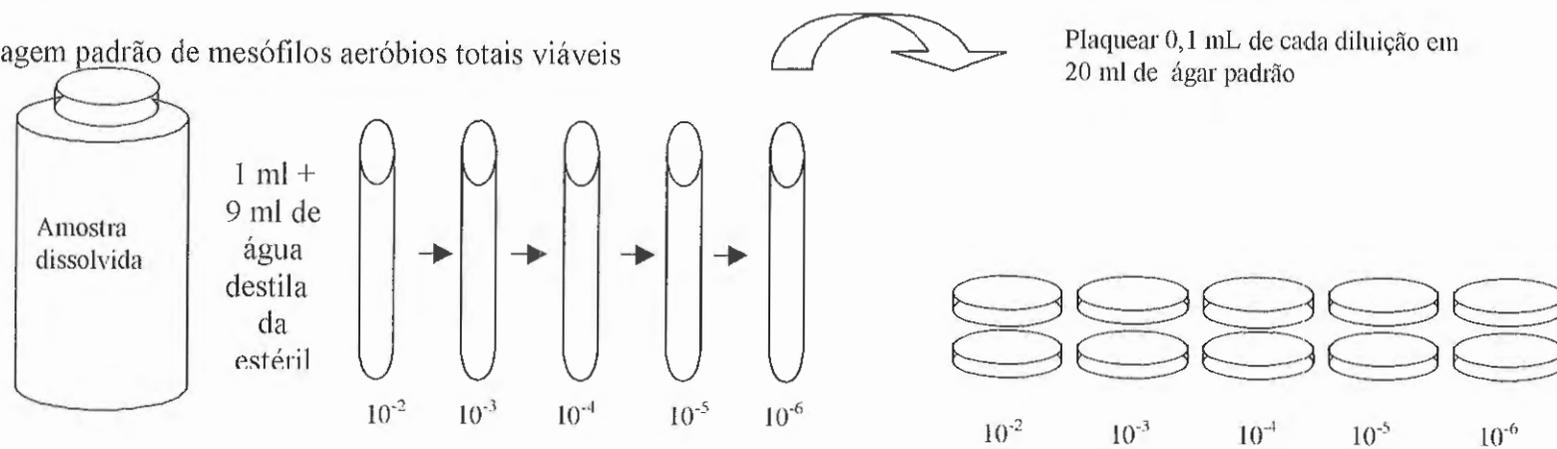


Figura 4.3.3 Contagem de bolores e leveduras e contagem de mesófilos totais viáveis

#### 4.3.5 Contagem de coliformes totais e fecais

As enterobactérias são bastonetes gram-negativos facultativos, com metabolismo respiratório e fermentativo. A presença desses organismos é indicadora da contaminação da amostra por dejetos fecais ou higiene deficiente durante o processamento do material. A literatura cita algumas opções para a investigação desse grupo. Destacamos aqui dois métodos que foram comparados: a técnica de tubos múltiplos em diluição seriada, da qual se obteve o número mais provável de microrganismos (NMP) e a contagem de bactérias viáveis em placas contendo meios seletivos. Para a contagem de *E. coli*, o procedimento a ser seguido foi o mesmo para a contagem de coliformes, variando somente a temperatura de incubação. O Teste confirmativo utilizado para o grupo é o de produção de ácido à partir de manitol e motilidade.

##### 4.3.5.1 Método dos tubos múltiplos

Na técnica dos tubos múltiplos o meio de cultura empregado foi o caldo lactosado segundo Eijkman acrescido de uma solução de vermelho de fenol. Os bacilos gram negativos não esporulados que fermentam lactose com produção de ácido e de gás em um período de 48 horas a 37°C são coliformes. Nesse teste, após a diluição sucessiva, 0,5ml de cada amostra são inoculadas em tubos contendo 4,5 ml de meio de cultura com tubo de Durham invertido previamente esterilizado em triplicata para cada concentração da diluição. Na presente investigação os testes foram preparados em duplicata para a determinação do NMP nas duas rações. Nesse teste, a temperatura de incubação determina o resultado. Quando o material é incubado a 37°C temos como resultado o NMP de coliformes totais. Por outro lado, quando o material é incubado a 45°C, temos o NMP de Coliformes fecais ou termotolerantes (*E. coli* e *Klebsiella*). A interpretação dos resultados considera o

número de tubos positivos (formação de gás e viragem de pH). O número de tubos positivos de cada diluição constitui a fórmula numérica que segundo a tabela de McCrady, determina o número de microrganismos por 100ml para séries de 3 tubos. Quando essa prova presuntiva for positiva o conteúdo do tubo deve ser repicado para tubos contendo Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante e Caldo E.C. conforme descrito na figura 4.3.5.1. A confirmação bioquímica é o teste da oxidase. As enterobactérias são oxidase negativas. A Coloração de Gram também deve ser utilizada. Em casos onde só há viragem do indicador de pH, uma nova inoculação da amostra suspeita deve ser feita em caldo lactosado duplo.

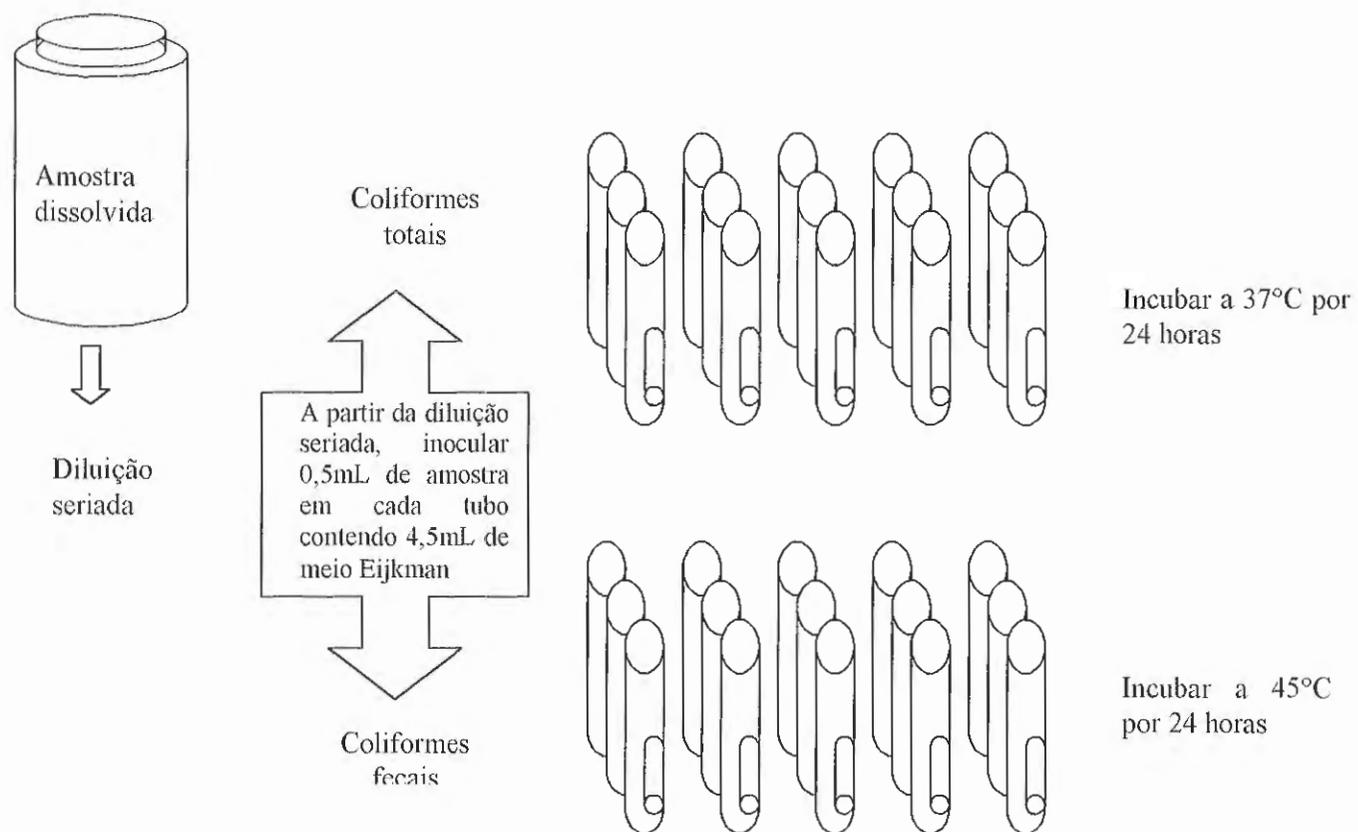


Figura 4.3.5.1 Contagem de coliformes totais e fecais ( tubos múltiplos)

#### 4.3.5.2 Pesquisa de *E. coli*

O meio de cultura indicado para a contagem em placas é o agar eosina azul de metileno (EMB). O crescimento de bactérias gram-positivas é amplamente inibido pela presença dos corantes e a composição de açúcares permite diferenciar as colônias de interesse. As placas semeadas e incubadas a 35°C por 24 horas representam o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de coliformes totais viáveis. Nas placas incubadas a 45°C o desenvolvimento esperado é de colônias de *E. coli*. Após a incubação devem ser contadas as colônias com diâmetro maior que 0,5 mm., deve-se selecionar um número de colônias representativo e inoculá-las em tubos contendo caldo lactosado, com tubos de Durham para confirmação da produção de gás. Esses tubos devem ser incubados a 35°C por 24 horas. As colônias de coliformes podem ser diferenciadas das colônias de *E. coli* pela sua morfologia. As colônias de *E. coli* apresentam cor brilhante, metálica, esverdeada, enquanto as demais enterobactérias apresentam uma coloração azulada.

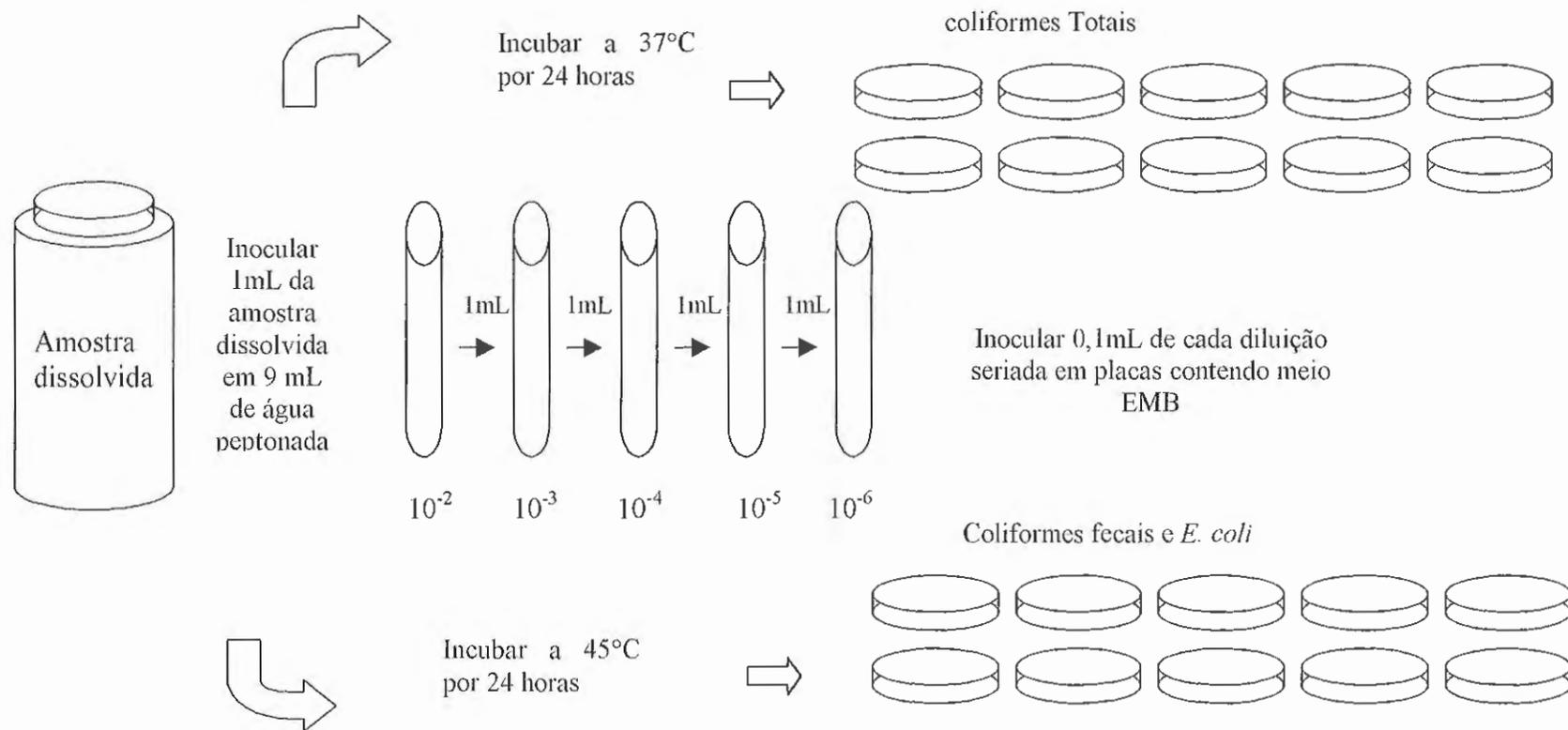


Figura 4.3.5.2 Contagem de Coliformes totais e fecais (contagem em placas)

#### 4.3.6 Pesquisa de *Salmonella*

A determinação da presença ou não de microrganismos do gênero *Salmonella* por uma técnica única é, em parte, dificultada pelo grande número de sorotipos existentes deste gênero. A presente avaliação foi fundamentada em técnicas utilizadas em diferentes classes de alimentos. A pesquisa pode ser dividida em três passos: uma primeira etapa de enriquecimento, a etapa seguinte de semeadura em meios seletivos e uma etapa final de confirmação. Em um primeiro passo inoculou-se, em meio não seletivo para amostras provenientes de alimentos secos, 1ml do produto solubilizado foi semeado em caldo lactose. No passo seguinte, faz-se a semeadura em placas contendo meios seletivos.

Neste experimento, o meio de cultura empregado após a revitalização foi o caldo tetrionato. Subseqüentemente o meio de alto poder de seleção foi o ágar bismuto sulfito.

A incubação foi feita a 37°C por um período de 24 horas. As colônias que tiveram comportamento típico de *Salmonella* passaram então à identificação sorológica com ajuda do anti-soro polivalente para o grupo. Para realizar tal exame colônias suspeitas foram retiradas das placas de bismuto sulfito e repicadas em caldo BHI. Após incubação por 24 horas uma fração desse caldo é depositado em lâmina juntamente com soro polivalente para *Salmonella*. O mesmo foi feito com uma colônia de *Salmonella* como controle da aglutinação.

Simultaneamente o meio PESSOA e SILVA foi inoculado e incubado por 24 horas a 37°C.

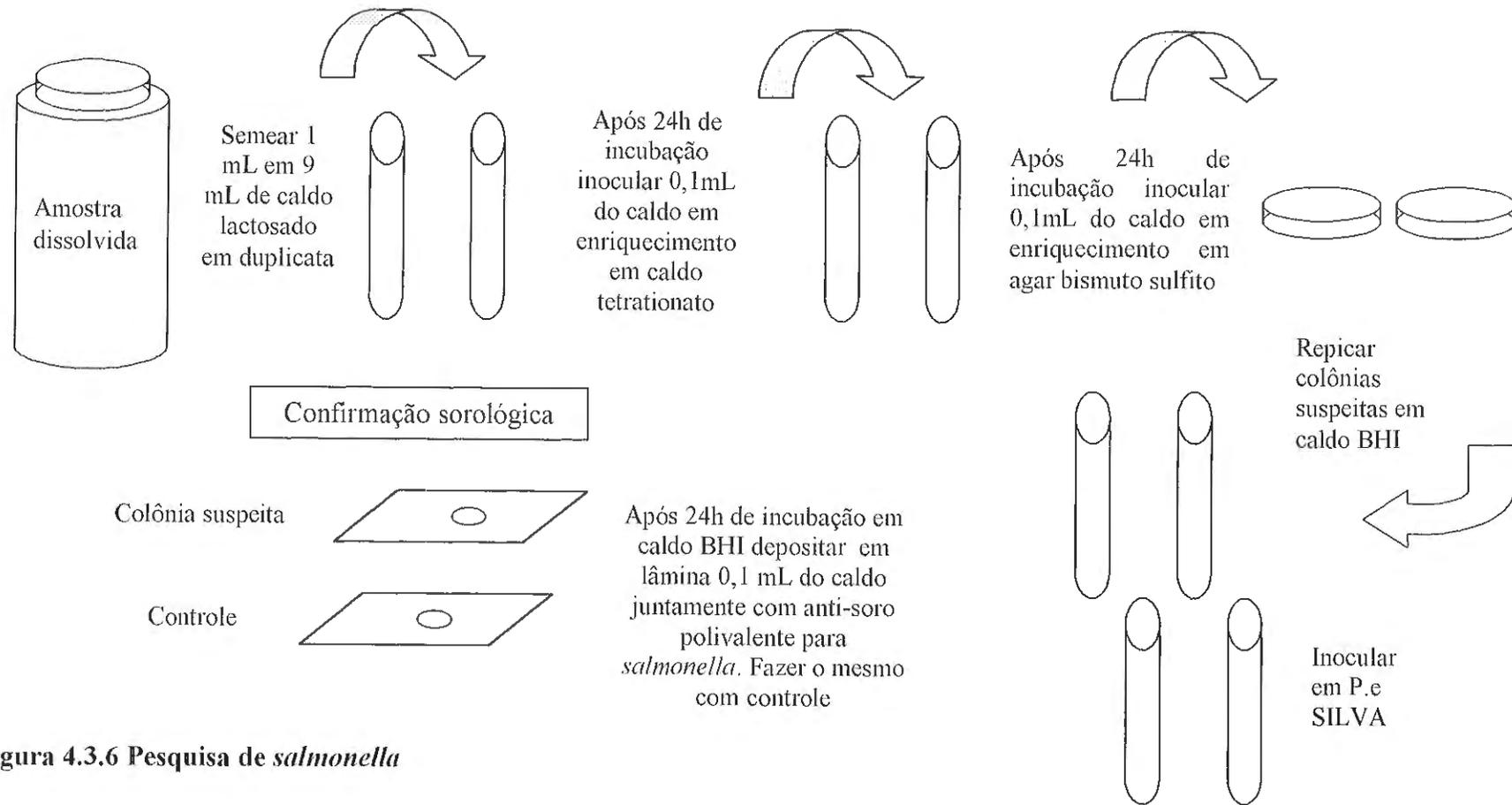


Figura 4.3.6 Pesquisa de *salmonella*

#### 4.3.7 Enumeração de *Staphylococcus aureus*

A enumeração para detectar a presença de *Staphylococcus aureus* foi feita com a utilização de diluições que em pelo menos uma tenha se obtido resultado negativo. De cada diluição previamente preparada se transfere 0,1 ml a uma placa que contenha 20, ml de agar Chapman. A seletividade desse meio está fundamentada na tolerância dos *Staphylococcus* ao cloreto de sódio e na degradação de manitol bem como de gelatina com conseqüente formação de ácido. As placas são incubadas a 37°C durante 48 horas. Após a incubação semeia-se, a partir do ágar Chapman por estrias, placas contendo Vogel Johnson agar (Merck 5405). Em seguida, as placas assim semeadas são incubadas a 37°C por 48 horas. Placas que apresentaram crescimento de colônias suspeitas de *S. aureus* foram repicadas para o meio caldo de cérebro e coração (BHI). Estas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida da cultura assim obtida, retira-se uma alíquota de 0,1ml a qual se junta 0,3ml de plasma de coelho, em tubos de Kline, e se incuba a 37°C. Após 4 horas observa-se os tubos, aqueles que apresentarem coágulo são coagulase positivos.

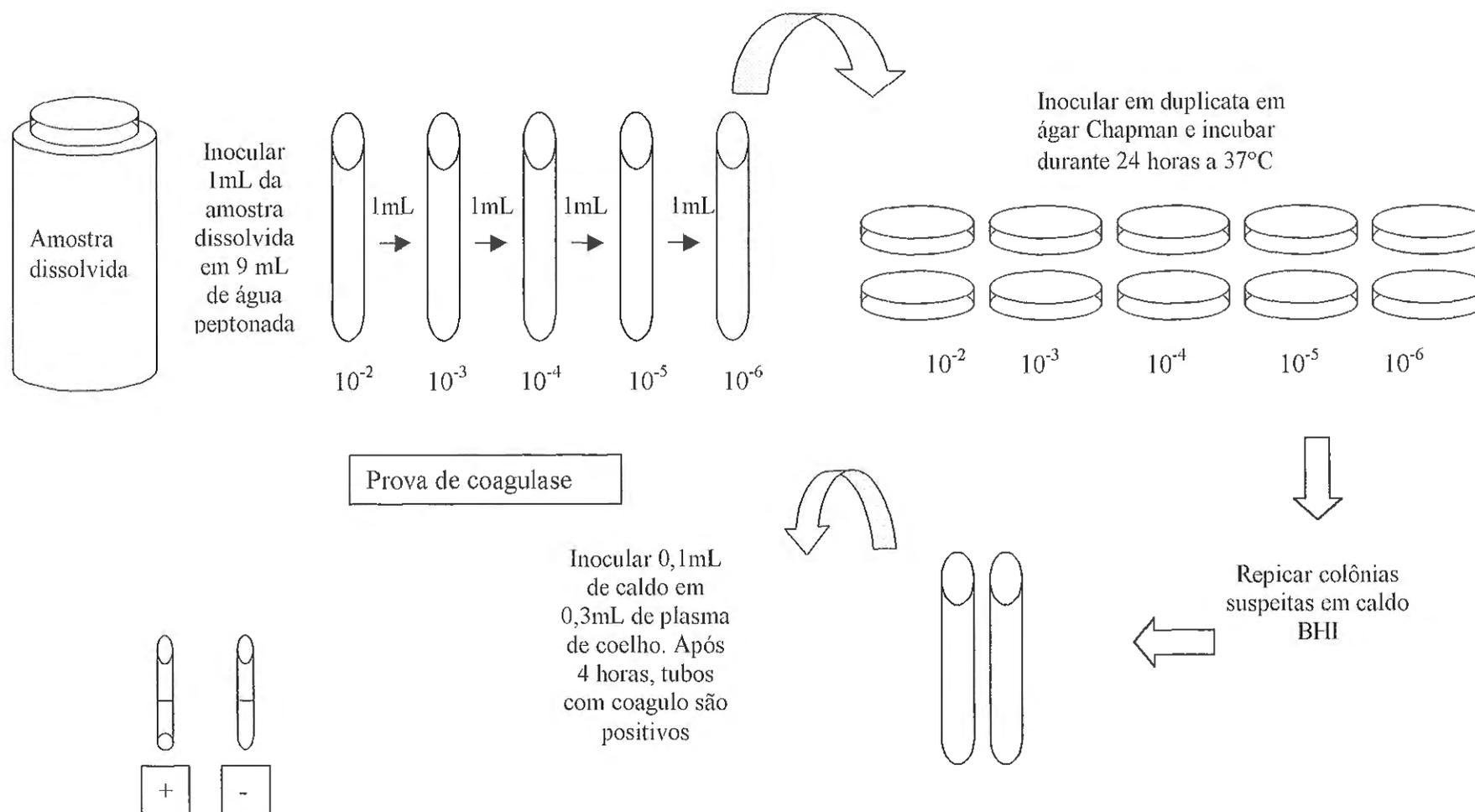


Figura 4.3.7 Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

#### 4.3.8 Enumeração de *Bacillus cereus*

O método mais utilizado para a identificação de *Bacillus cereus* é aquele descrito por MOSSEL, Koopman e Jongerius (1967). Esse método é recomendado, para a pesquisa das formas vegetativas assim como as esporuladas, em todos tipos de alimentos.

Para a pesquisa, preparou-se a diluição seriada de acordo com o método descrito e semeia-se 0,1ml dessa diluição em superfície de agar Mossel seletivo para *cereus* com auxílio da alça de Drigalski. As placas assim semeadas foram incubadas a 30°C por 48 horas. As colônias de *cereus* apresentam-se com uma zona profunda de cor rosa até vermelho púrpura e com halo de precipitado branco devido a produção de lecitinase. As colônias de *B. cereus*, por serem manitol negativas, podem ser distinguidas das demais culturas manitol-positivas, que apresentam uma viragem de cor ao redor das colônias. Para a confirmação de *B. cereus* inocula-se, a partir dos cultivos, placas de agar amido, caso ocorra a hidrolização do amido o resultado é confirmatório de *B. cereus*.

Outra forma de confirmar consiste em repicar as colônias suspeitas para caldo nitrato, que é degradado pelas colônias de *cereus*. Para realizar essa prova, repicou-se colônias suspeitas em caldo nitrato que é incubado a 30°C por 2 horas. A mudança de cor para vermelho indica reação positiva.

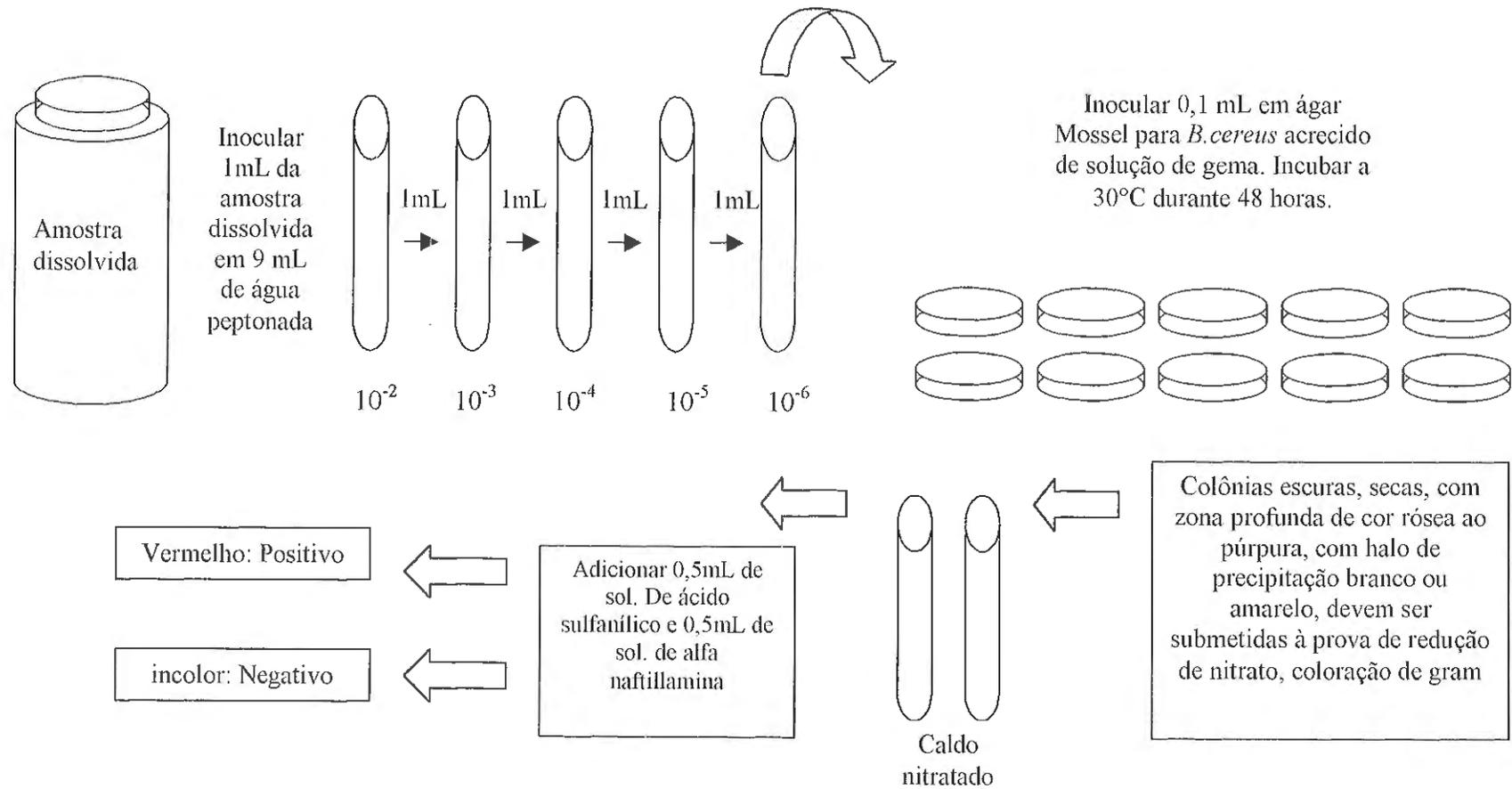


Figura 4.3.8 Pesquisa de *Bacillus cereus*

## 5. Resultados

### 2. Coleta seletiva

O programa de coleta seletiva foi executado no bairro Santa Felícia, em São Carlos – S.P., por ser um bairro residencial (maior volume de resíduos produzidos) e por ser próximo ao *campus* da U.S.P.

No laboratório de Resíduos Sólidos o material coletado foi pesado em balança de mesa com capacidade para 20 kg. Dados referentes ao número de residências fornecedoras de resíduos/dia, Massa do material bruto total coletado e Massa após processamento do material constam da tabela 5.1.

Tabela 5.1 Dados sobre a Coleta seletiva

Nº da coleta	Data da coleta	Nº de residências que forneceram resíduos	Massa bruta coletada.*	Massa após processamento *
1	28/07	6	6,380	1,560
2	29/07	7	10,780	1,600
3	30/07	10	11,860	2,280
4	31/07	8	10,680	1,960
5	01/08	8	11,720	1,940
6	02/08	9	14,540	2,320
7	03/08	8	12,320	2,460
8	04/08	7	11,320	2,080
9	05/08	10	9,040	1,720
10	06/08	7	9,220	1,380
Total			107,860	19,300

(\*)Valores expressos em kg

O processo de coleta foi extremamente ágil e eficiente, com ampla participação da comunidade envolvida. Muitos moradores da região ofereceram-se como voluntários para participar do programa de coleta seletiva. Na grande maioria das vezes os resíduos eram segregados conforme as orientações fornecidas, sendo encontrados portanto poucos objetos estranhos, como tampas de garrafas, sacos plásticos e palitos.

#### 5.1.1. Processamento do material coletado

Após a pesagem, os sacos foram distribuídos no chão próximo ao triturador, abertos visando uma caracterização prévia dos resíduos, bem como para programar sua entrada no triturador de acordo com seu grau de umidade e retirar possíveis materiais que não fossem resíduos alimentícios.

A trituração foi feita em desintegrador/picador forrageiro do tipo JF 2, marca JF Nogueira. Os resíduos foram colocados no aparelho pelo coletor de entrada de acordo com sua umidade. Os mais secos foram triturados primeiro, tentando evitar assim a obstrução do coletor de saída. A peneira usada permitiu a passagem de fragmentos com granulometria igual ou menor a 5mm., estabelecida como mais adequada para esse tipo de resíduo. Após triturados, os resíduos foram coletados em bandejas plásticas retangulares da marca Marfinite, com dimensões de 40cmx60cm com 12cm de altura. O material triturado recebeu dois tipos de tratamento: O material processado inicialmente foi submetido a uma secagem prévia ao sol para averiguar a eficiência da esterilização da ração pela ação dos raios solares, como alternativa de menor gasto energético para o processo, evitando a autoclavagem e posteriormente, seco em estufa de ventilação forçada à 60°C, por aproximadamente 24 horas. Já o restante do material coletado no dia foi submetido a autoclavagem a 121°C por 15 minutos e posteriormente secas em estufa de ventilação forçada como a primeira parte do material.

A umidade das duas rações obtidas ficou em torno de 5%, abaixo portanto do limite legal estabelecido de 12%.

## 5.2. Exame microbiológico

Os exames das rações foram desenvolvidos nos laboratórios do Departamento de Morfologia e Patologia DMP da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. Para tanto foram utilizados materiais de uso permanente e de consumo descritos nos métodos deste trabalho. Uma listagem discriminando os equipamentos e materiais de consumo necessários à realização desses exames consta dos anexos deste, com o objetivo de servir de parâmetro para a adequação futura das dependências do Laboratório de Resíduos Sólidos da Escola de Engenharia de São Carlos EESC – Universidade de São Paulo, para que seja possível desenvolver esse tipo de atividade nesse laboratório.

### 5.2.1. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi repetida três vezes. Cada uma das vezes a semeadura foi feita em duplicata. O resultado expresso na tabela a seguir representa o resultado médio da contagem das duas placas inoculadas. O contador de colônias utilizado pode ser observado na figura 5.2.1. O limite de referência utilizado no presente trabalho determina que para ser apta ao consumo a amostra não deve apresentar número de bolores e leveduras superior a 5000 UFC/g, ou seja,  $5 \times 10^3$ . Os resultados dos exames podem ser observados na tabela 5.2.1. De modo geral o tratamento térmico pareceu ser eficiente, pois duas das três amostras analisadas não apresentaram bolores ou leveduras. No ensaio onde estes foram observados, o desenvolvimento dessas colônias ocorreu acima dos limites em diluições menos concentradas e dentro dos limites em diluições mais concentradas, o que sugere contaminação durante o plaqueamento.

Duas das três amostras que não foram submetidas a tratamento térmico apresentaram número de UFC acima do permitido pela legislação

Tabela 5.2.1 Resultados da contagem de bolores e leveduras

Ração	Quantidade
Inicial (não autoclavada)	$5.3 \times 10^6$ UFC/g
Final (autoclavada)	$1,6 \times 10^3$ UFC/g



Figura 5.2.1 Contador de colônias

#### Contagem padrão em placa PCA

O exame de contagem padrão em placas foi realizado em duplicata. A tabela 5.2.2 representa a média do resultado da contagem das duas placas inoculadas. Embora a legislação não estabeleça limites para a contagem de mesófilos totais viáveis, nesse produto os resultados sugerem um número de acordo ao encontrado em outros alimentos destinados à alimentação humana.

Tabela 5.2.2 Resultados de contagem de mesófilos totais viáveis em PCA

Ração	Quantidade
Inicial (não autoclavada)	$3,4 \times 10^6$ UFC/g
Final (autoclavada)	$1,2 \times 10^5$ UFC/g

Contagem de coliformes totais e de *E. coli*

Esse exame foi realizado com a utilização de duas técnicas distintas conforme o proposto nos métodos deste trabalho. Os resultados dos exames, bem como a discussão desses resultados constam a seguir.

## 5.2.1.1. Método dos tubos múltiplos (NMP)

O exame dos tubos múltiplos foi realizado duas vezes. Os resultados podem ser observados nas tabelas 5.2.3.1 a – b, assim como algumas imagens dos experimentos na página seguinte.

Tabela 5.2.3.1 a Resultados de pesquisa de Coliformes totais e *E.coli* segundo o método de tubos múltiplos 1º exame

Concentração	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
Ração final (autoclavada)	0	0	0	0	0
Ração inicial	3	3	3	2	1
Ração final (autoclavada) 45°C	0	0	0	0	0
Ração inicial 45°C	3	2	2	1	0

Tabela 5.2.3.1 b Resultados de pesquisa de Coliformes totais viáveis e *E.coli* segundo o método de tubos múltiplos 2<sup>o</sup> exame

Concentração	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Ração final (autoclavada)	1	0	0	0	0
Ração inicial	3	2	2	2	0
Ração final (autoclavada) 45°C	0	0	0	0	0
Ração inicial 45°C	3	2	2	0	0

Estes resultados, segundo a distribuição de Poisson, correspondem na tabela de McCrady ao número mais provável de coliformes totais (NMP) aos valores descritos na tabela 5.2.3.1 c. Porém, o resultado positivo das provas presuntivas foi parcial, isto é, os tubos apresentaram somente viragem na cor do indicador de pH, devido à atividade bacteriana, não apresentando formação de gás. Após repicagem dessa cultura em caldo de crescimento, as amostras foram examinadas nos testes confirmatórios. Conforme descrito anteriormente, foi feita semeadura da primeira diluição em caldo verde brilhante, caldo lactosado simples e caldo lactosado duplo, sendo que em nenhum dos tubos assim semeados observou-se crescimento. As provas confirmatórias executadas no decorrer do experimento não indicaram a presença de coliformes assim como de *E. coli*. Parte dessa cultura foi observada em microscópio. Submetido à coloração de Gram, o material examinado apresentou bacilos Gram positivos, relativamente curtos. Esses bacilos foram submetidos às provas bioquímicas para identificação de *B. cereus*, sendo a presença não confirmada.

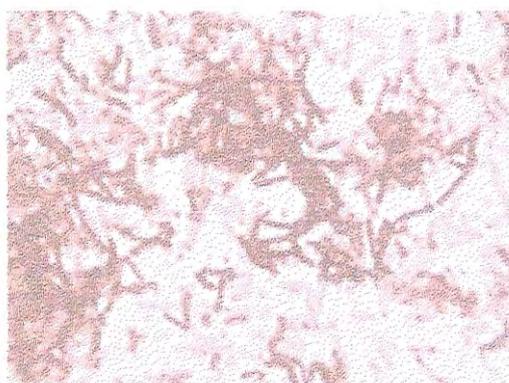


Figura 5.2.3.1 a Microfotografia de Bacilos incubados em caldo lactosado simples repicado a partir de tubos múltiplos

Tabela 5.2.3.1 c NMP de enterobactérias totais viáveis (parcial positivo)

Ensaio	NMP/ g	
	1º exame	2º exame
Ração final (autoclavada)	0	40
Ração inicial	14.000	2.000
Ração final (autoclavada) 45°C	0	0
Ração inicial 45°C	2.000	11000

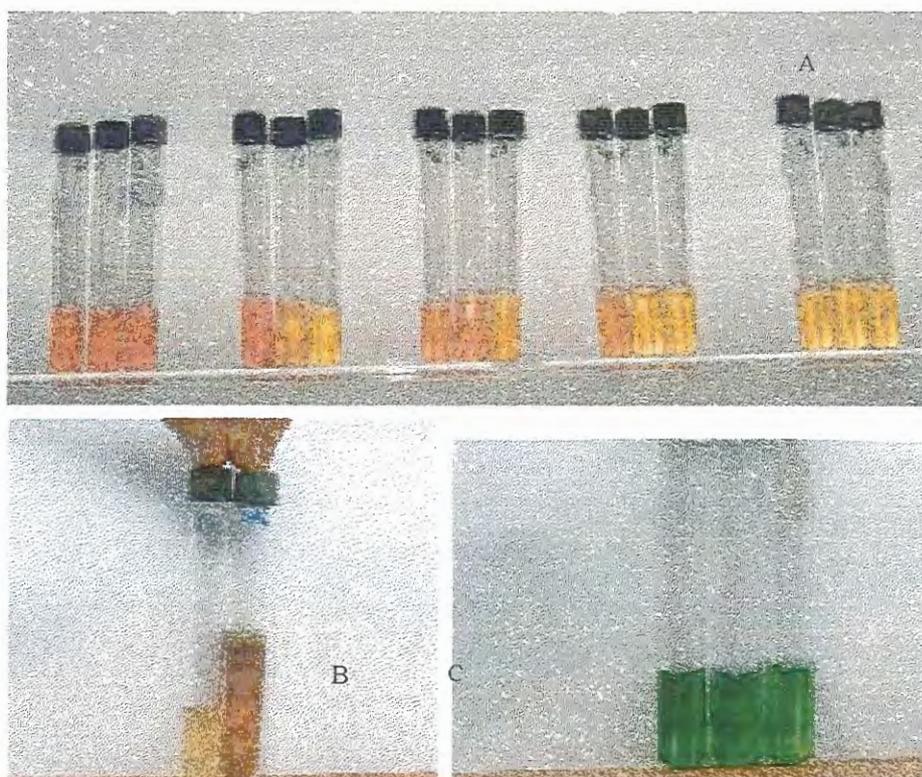


Figura 5.2.3.1 b Exame de tubos múltiplos 45°C (A); Prova confirmatória em CLS e CLD (B) e CVB (C)



Figura 5.2.3.1 c Exame de tubos múltiplos 37<sup>0</sup>C ração autoclavada

#### 5.2.1.2. Contagem em placas com meio seletivo EMB

A contagem de enterobactérias em placas com meio EMB foi realizada em duplicata. A amostra utilizada para o exame foi a mesma solubilizada para o segundo exame de tubos múltiplos. O volume plaqueado em cada placa foi de 0,1mL. Incubadas à 37 e 45<sup>0</sup>C as placas, em diferentes concentrações, não apresentaram crescimento de colônias.

#### Pesquisa de *Salmonella*

A pesquisa de *Salmonella* foi desenvolvida conforme o método descrito. A pesquisa foi desenvolvida duas vezes. Na primeira inoculação houve o desenvolvimento de colônias no agar bismuto sulfito, porém não confirmadas pelo teste sorológico. Na segunda experimentação, a alíquota repicada a partir do caldo tetracionato não demonstrou desenvolvimento em agar bismuto sulfito. Nessa amostra, conforme o recomendado, prorrogou-se o tempo de incubação até 48 horas e mesmo assim a ausência de *Salmonella* se confirmou.

## Enumeração de *Bacillus cereus*

A pesquisa de *Bacillus cereus* foi desenvolvida conforme o método descrito. Os resultados obtidos estão representados na tabela 5.2.5. Embora a redução de nitrato sugira a presença de *B. Cereus*, a capacidade de produzir ácido a partir de manitol sugere a presença de outra espécie de *Bacillus*. A prova de redução de nitrato está registrada a seguir na figura 5.2.5. Notamos, da esquerda para direita, tubo com meio estéril, tubo com cultura repicada a partir de agar Mossel e tubo de meio nitrato reduzido quimicamente. Como HARRIGAN destaca em suas observações, uma grande gama de alimentos pode apresentar contaminação por espécies do gênero *Bacillus* devido ao fato de ser um grupo presente em ambientes muito diversificados, principalmente no solo.

Tabela 5.2.5 Resultados da enumeração de *B. cereus*

Ração	Quantidade
Inicial (não autoclavada)	$3,5 \times 10^6$ UFC/g
Final (autoclavada)	$1,9 \times 10^5$ UFC/g

Esses resultados sugerem uma presença de *Bacillus*. Embora a pesquisa desse microrganismo não seja exigência do exame de rações estabelecido pela legislação, o limite de *B. cereus* para produtos destinados à alimentação humana é da ordem de 1.000/g.

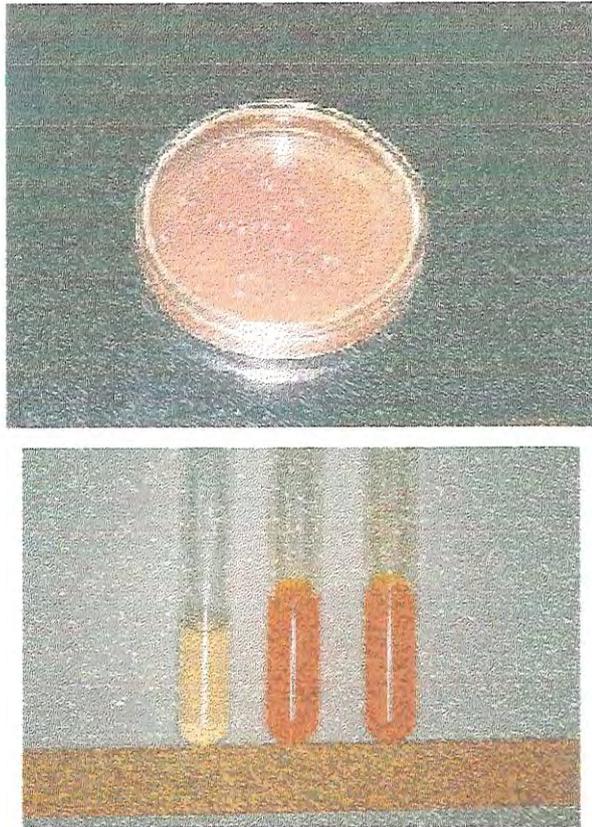


Figura 5.2.5. Agar Mossel (acima) e prova de redução de nitrato (abaixo)

#### Enumeração de *Staphylococcus aureus*

A enumeração de *Staphylococcus aureus* foi feita conforme o método descrito. Embora algumas colônias tenham se desenvolvido nas placas de agar Chapman, estas ao serem submetidas ao teste de coagulase, apresentaram-se negativas. A placa de agar Chapman com colônias suspeitas podem ser observadas na figura 5.2.6.



Figura 5.2.6 Agar Chapman com colônias suspeitas de *S. aureus*

## 6. Discussão

### 6.1. Processamento do material coletado

Foram usadas bandejas plásticas retangulares da marca Marfinite, com dimensões de 40cmx60cm com 12cm de altura. O uso desse tipo de bandeja, em lugar das bandejas de menor dimensão usadas por VIANA (20x30x10cm.), podem ter contribuído para redução do tempo necessário à secagem. Vale destacar aqui uma diferença no procedimento adotado no presente trabalho e o trabalho desenvolvido por VIANA: para retirada do material do autoclave, convém deixar que este resfrie com a válvula de saída de vapor fechada e não aberta como foi a prática do referido autor. A abertura da válvula antes do resfriamento faz com que a água do autoclave em ebulição molhe demasiadamente o material no seu interior, elevando assim o tempo necessário à secagem do material. O processo de esterilização em autoclave acarreta sem dúvida, em perdas de vitaminas e desnaturação de proteínas. Tais perdas podem ser reduzidas, como constatou WILLIAMS *et. al.*(1968). Ele descobriu que o tempo necessário para obtenção da esterilidade pode ser reduzido através do uso de temperaturas mais elevadas.

O tempo de secagem do material coletado no presente trabalho foi relativamente inferior ao tempo registrado por VIANA, devido aos motivos já mencionados bem como à menor quantidade de material processado.

Conforme descrito por VIANA, os custos de produção da ração alternativa, mesmo em escala piloto, são inferiores quando comparados ao custo da ração comercial. Essa redução no custo de produção pode ser ainda maior, principalmente se considerarmos a utilização de fontes alternativas de energia para a esterilização e secagem. Uma alternativa possível é a produção de biogás a partir de parte da matéria orgânica coletada que seria usado no processo de produção da ração.

## 6.2. Exame microbiológico

Considerando os resultados obtidos nos exames realizados, o processo de esterilização demonstrou ser eficiente no tratamento dos resíduos alimentícios domiciliares. Tomando por base o estudo realizado por MORTATTI *et al.* (1992) é possível fazer uma comparação genérica das condições higiênico-sanitárias dos produtos analisados. MORTATTI fez a avaliação microbiológica de doces cremosos comercializados na cidade de Araraquara. Em nenhuma das 39 amostras foi isolada *Salmonella*, porém em 18% delas foi constatada a presença de *Staphylococcus aureus* e em proporções variáveis verificou-se a presença de microrganismos deteriorantes e daqueles indicadores de contaminação fecal.

Durante o desenvolvimento da etapa experimental alguns pontos críticos do processamento foram detectados. Esses pontos podem estar relacionados com a contaminação do material estudado. Supõe-se que, ainda nas residências, a presença de animais domésticos pode influenciar qualitativamente e quantitativamente a presença de microrganismos nos resíduos. Os sacos utilizados na coleta dos resíduos podem conter microrganismos. NADER & ITURRINO (1989) estudaram as características microbiológicas do leite tipo “C” e suas embalagens plásticas em uma usina de beneficiamento do estado de São Paulo. Do total de embalagens amostradas 31.8% apresentaram contagens acima dos limites legais, ou seja, acima de 100 microrganismos mesófilos/ml, estando portanto o alimento fora das normas para o consumo humano.

O triturador e a estufa de secagem também são pontos onde pode ter ocorrido contaminação do material. O Triturador, por possuir pontos de difícil higienização, e a estufa por ser usada para secagem de substâncias muitas vezes com alto grau de contaminação microbiológica como vinhaça e chorume.

O tempo elevado de estocagem pode ter influenciado os resultados. De acordo com a legislação vigente, o prazo de armazenamento não pode ser superior a um mês, sendo esse o período de validade para produtos destinados à alimentação animal. No presente trabalho o material só foi analisado 4 meses após o

processamento. Embora os resultados da presente pesquisa indiquem uma qualidade que atende às normas relacionadas à fabricação de rações, não se pode afirmar que este foi o quadro durante todo o período de armazenamento. SILVA *et. al* (1993) estudaram as condições microbiológicas dos recortes de carne de bovinos, na mortadela formulada com matérias primas vegetais, antes e após o cozimento, e durante noventa dias enquanto estocada a 27<sup>o</sup>C em intervalos de 7 dias. Os resultados de contagem padrão em placa para os recortes de carne bovina e para a mortadela crua foram da ordem de  $7,6 \times 10^5$  UFC/g e  $2,6 \times 10^5$  UFC/g respectivamente, enquanto o produto final apresentou variação de  $1,8 \times 10^4$  UFC/g a  $7,0 \times 10^5$  UFC/g. Nesses produtos o crescimento de bolores e leveduras iniciaram seu crescimento a partir do 63<sup>o</sup> dia de estocagem.

Algumas particularidades foram notadas com relação aos exames utilizando o método dos tubos múltiplos. Os resultados parcialmente positivos nesses exames podem estar relacionados com a composição do substrato. CURTIS & BEUCHAT (1998) destacam em seus estudos sobre os problemas e perspectivas do controle de qualidade dos meios de cultura, que podem existir problemas na detecção de microrganismos em alimentos utilizando meios seletivos. A seletividade desses meios pode ser influenciada pelos constituintes do próprio alimento.

Parece pouco provável que tenha ocorrido inibição de microrganismos pela presença de componentes antimicrobianos dos resíduos estudados como é comum ocorrer em temperos prontos. FRANCO (1989) destaca entre esses componentes antimicrobianos os compostos dissulfídricos alifáticos presentes no alho e cebola e o carvacrol do orégano. Além desses componentes, essas misturas de temperos tem condições desfavoráveis ao desenvolvimento microbiano, já que são ácidos, com pH entre 3,2 e 3,9 e de umidade intermediária. O produto obtido no presente trabalho apresentou pH levemente ácido, 6,5, porém baixa umidade.

### 6.3. Viabilidade do processo

Do ponto de vista microbiológico é possível afirmar que o emprego dessa reção com base em resíduos na elaboração de ração para aves é viável. Trabalho semelhante foi desenvolvido por pesquisadores da PUCCAMP. O trabalho mencionado tinha como objetivo reciclar resíduos orgânicos gerados a partir de feiras e mercados. Foi dividido em quatro etapas: coleta e seleção do lixo, cozimento, secagem e dosagem. Entre os resultados, destaca-se o fato de nenhum dos lotes de frangos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações da mistura ração comercial/ração de lixo ter apresentado qualquer anomalia no que se refere ao tempo de vida. Porém, os frangos alimentados com ração composta na proporção 1:1 (ração comercial: ração de lixo) apresentaram crescimento abaixo da média. Os autores destacam a possibilidade de substituir 30% da ração comercial por ração obtida a partir de resíduos orgânicos.

VIANA, (1999) obteve resultados semelhantes quando avaliou a viabilidade da utilização de resíduos alimentícios como ingrediente para ração de frangos de corte. O trabalho foi executado em quatro etapas distintas: Coleta seletiva; Processamento; Caracterização e Avaliação de viabilidade nutricional. De acordo com a experimentação em frangos de corte realizada no trabalho, o produto obtido pode substituir em até 25% da ração comercial. O produto obtido pelo referido autor foi submetido ao exame microbiológico previsto na portaria 108 de 4 de setembro de 1991 (BRASIL, 1991) nos laboratórios do projeto Determinação de Biodegradabilidade e Atividade Antimicrobiana (DBAA) na UFSCar. O resultado do laudo técnico aprova o uso do produto para a alimentação animal. O emprego desse ingrediente para ração é fortalecido pelos resultados das análises de caracterização química bem como o exame de micotoxinas, pesticidas, metais pesados e uma boa composição de nutrientes importantes na avicultura como proteína, cálcio, fósforo e energia metabolizável.

## 7. Conclusões

De acordo com os exames executados e os resultados obtidos foi possível chegar a algumas conclusões que são discriminadas a seguir.

Podemos destacar, em harmonia com o objetivo principal do trabalho, que o uso da ração alternativa produzida a partir de resíduos orgânicos domiciliares, quando submetida ao processo de esterilização com vapor e pressão é viável do ponto de vista microbiológico. Uma vez submetida aos exames pertinentes esta não apresentou nenhum tipo de resultado que sugerisse a presença de qualquer microrganismo nocivo a saúde animal, estando inclusive de acordo com normas de qualidade microbiológica para consumo humano.

A ração submetida somente ao calor seco para redução da umidade demonstrou não ser adequada ao consumo animal, uma vez que apresentou características em desacordo com a legislação de referência nos exames de contagem de bolores e leveduras.

Em relação às diferentes técnicas utilizadas para a quantificação de enterobactérias totais viáveis, as duas técnicas utilizadas; método de tubos múltiplos e o método de contagem em placas com meio seletivo eosina azul de metileno; apresentaram resultados harmoniosos, isso é, em nenhum dos métodos houve resultado positivo. Porém vale destacar que o método de tubos múltiplos é de preparação mais onerosa e demorada.

Considerando o não comprometimento microbiológico do produto obtido e a redução do custo da ração, quando comparado às rações comerciais, podemos concluir que a alternativa de reciclar a matéria orgânica em ração alternativa para aves é uma possibilidade viável economicamente e recomendável ambientalmente para a realidade de São Carlos.

## 8. Anexos

### 8.1. Meios de cultura

#### Água peptonada (g/litro)

Peptona..... 1,0

#### Ágar padrão PCA (g/litro)

Peptona de caseína.....5,0

Extrato de levedura.....2,5

D(+) glucose.....1,0

Agar .....20,0

pH – 7,0 ± 0,1

#### Agar sabouraud (g/litro)

Peptona de caseína.....5,0

Peptona de carne.....5,0

D(+) glucose.....40,0

Maltose.....10,0

Agar.....20,0

pH – 5,6 ± 0,1

#### Caldo lactose segundo Eijkman (g/litro) requer tubo de DURHAM

Peptona de caseína..... 15,0

Hidrogenofosfato dipotássico.....4,0

Diidrogenofosfato potássico.....1,5

Cloreto de sódio.....5,0

Lactose.....3,0

pH – 6,8 ± 0,1

DURHAM Invertidos no tubo de  
ensaio

#### Caldo bile verde brilhante(g/litro)

Peptona de carne.....8,6

Bile bovina seca.....8,0

Cloreto de sódio.....6,4

Carbonato de cálcio.....20,0

Tetrationato potássico.....20,0

Verde brilhante.....0,07

pH – 7,2 ± 0,1

#### Agar Salmonella Shigella (g/litro)

Peptona.....10,0

Lactose.....10,0

Bile (seca).....8,5

Citrato de sódio.....10,0

Tiosulfato de sódio.....8,5

Citrato ferrico (III)de amônia. 1,0

Verde brilhante.....0,0003

Vermelho neutro.....0,025

Agar.....20,0

pH – 7,0 ± 0,1

Autoclavar com os tubos de

**Agar EMB (g/litro)**

Peptona.....	10,0
Hidrogenofosfato dipotássico.....	2,0
Lactose.....	5,0
Sacarose.....	5,0
Eosina.....	0,4
Azul de metileno.....	0,07
Agar.....	20,0

pH – 7,1 ± 0,1

**Agar Vogel Johnson (g/litro)**

Peptona de caseína.....	10,0
Extrato de levedura.....	5,0
Dipotássio hidrogênio fosfato	5,0
Manitol.....	10,0
Cloreto de lítio.....	5,0
Glicina.....	10,0
Vermelho fenol.....	0,025
Agar.....	12,0

**Caldo EC (g/litro)**

Peptona de caseína.....	20,0
Lactose.....	5,0
Mistura de sais biliares.....	1,5
Cloreto de sódio.....	5,0
Hidrogenofosfato dipotássico.....	4,0
Diidrogenofosfato potássico.....	1,5

pH – 6,9 ± 0,2

**Agar violeta cristal bile (g/litro)**

Peptona de carne.....	7,0
Extrato de levedura.....	3,0

Cloreto de sódio.....	5,0
Lactose.....	10,0
Vermelho neutro.....	0,03
Mistura de sais biliares.....	0,002
Agar.....	20,0

pH – 6,9 ± 0,2

**Caldo lactose (g/litro)**

Peptona de gelatina.....	5,0
Extrato de carne.....	3,0
Lactose.....	5,0

pH – 6,9 ± 0,2

**Caldo tetracionato (g/litro)**

Extrato de carne.....	0,9
Peptona de carne.....	4,5
Extrato de levedura.....	1,8
Cloreto de sódio.....	4,5
Carbonato de cálcio.....	25,0
Tiosulfato de sódio.....	40,7
Bile bovina seca.....	4,75
Aditivos: solução iodeto de potássio (5,0) verde brilhante (0,01) e iodo 4,0	

pH – 6,9 ± 0,2

**Caldo bismuto sulfito (g/litro)**

Extrato de carne.....	5,0
Peptona de carne.....	10,0
D(+)glucose.....	5,0
Hidrogenofosfato dissódico.....	4,0
Sulfato de ferro.....	0,3
Verde brilhante.....	0,025
Indicador bismuto sulfito.....	8,0
pH – 6,9 ± 0,2	

**Agar Chapman (g/litro)**

Peptona de caseína.....	10,0
Extrato de levedura.....	2,5
Hidrogenofosfato dipotássico.....	5,0
Gelatina.....	30,0
Lactose.....	2,0
D(-) manitol.....	10,0
Cloreto de sódio.....	75,0
Agar.....	20,0
pH – 6,9 ± 0,2	

**Braian Hearth infusion (g/litro)**

Extrato de coração e peptona.....	27,5
-----------------------------------	------

Glicose.....	2,0
Cloreto de sódio.....	5,0
Hidrogênio fosfato dissódio.....	2,5
Agar.....	20,0
pH – 6,9 ± 0,2	

**Agar MOSSEL para *cereus*(g/litro)**

Peptona de carne.....	10,0
Extrato de carne.....	1,0
Manitol.....	10,0
Cloreto de sódio.....	10,0
Vermelho fenol.....	0,025
Agar.....	20,0
Aditivo: solução de gema de ovo e Polimixina	
pH – 6,9 ± 0,2	

**Caldo nitrato (g/litro)**

Peptona de carne.....	8,6
Cloreto de sódio.....	6,4
Nitrato de potássio.....	1,5

## 8.2. Adequação do Laboratório de Resíduos Sólidos

Para que seja possível acolher todas as etapas desenvolvidas no presente trabalho, o Laboratório de Resíduos Sólidos do Departamento de Hidráulica e Saneamento precisa receber algumas modificações físicas bem como adquirir equipamentos e materiais. Com a intenção de contribuir para uma eventual reestruturação desse laboratório relacionamos aqui alguns itens básicos para execução de exames microbiológicos, bem como algumas considerações sobre a estrutura física das instalações laboratoriais. Tais informações confrontadas com o inventário do material já existente no laboratório, podem dar uma noção das principais deficiências e conseqüentemente uma estimativa de custo de tal adequação.

### ❖ Esquema do laboratório

Para que seja possível desenvolver qualquer tipo manipulação de microrganismos em laboratório com êxito este deve obedecer, além das normas básicas de segurança como qualquer outro laboratório, normas específicas da área de biossegurança. As normas básicas da biossegurança são fundamentados em um código de boas práticas que consiste em:

- Barreiras primárias envolvendo os microrganismos para prevenir sua dispersão no laboratório
- Barreiras secundárias envolvendo o profissional que manipula os microrganismos para uma eventual falha na primeira barreira
- Barreiras que previnam o escape dos microrganismos não contidos pelas duas primeiras barreiras para o ambiente.

Para suprir as necessidades mínimas de segurança as instalações necessárias em um laboratório com esse objetivo consistem em:

- Comuns a qualquer laboratório (escritório, banheiros, almoxarifado...)
- Sala séptica
- Sala de preparação de meios e amostras
- Sala de descarte e autoclavagem

❖ Material permanente

<i>Equipamento</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Objetivo</i>
Estufas	4	Incubação de meios de cultura em diferentes temperaturas e secagem de material
Agitadores magnéticos com aquecimento	2	Elaboração de meios de cultura e solubilização de amostras
Balança analítica	1	Elaboração de meios de cultura e pesagem de amostras
Microscópio	1	Observação de colônias
Medidor de Ph $pH$	1	Medir Ph de meios de cultura
Destilador/deionizador	1	Produzir água para hidratação de meios de cultura e lavagem de vidraria
Autoclave	1	Esterilização de materiais, meios de cultura e de material de descarte
Contador de colônias	1	Contar colônias em placas de cultura

❖ Material de consumo

A quantidade de material de consumo listado a seguir como vidraria permite a realização de provas simultâneas de duas amostras diferentes ou o uso de rotina para uma amostra, uma vez que é necessária uma preparação prévia do material a ser

usado (lavagem, embalagem, esterilização e secagem) e isso deve contemplar a realização do teste com réplica.

❖ Vidraria

Material	Especificação (Volume)	Quantidade (unidades)
Pipetas graduadas	1mL	30
Pipetas graduadas	2mL	20
Pipetas volumétricas	10mL	10
Tubos de ensaio	15x150mm	150
Placas de Petri	12x80mm	100
Tubos de Duhram	5x50mm	50
Balões volumétricos	500mL	10
beckers	500mL	10
Erlenmeyer	500mL	5
Erlenmeyer	250mL	5

❖ Reagentes e corantes

Álcool

Acetona

Hipoclorito de sódio

Iodo

Cristal violeta

Safranina

Vermelho de fenol

Azul de metileno

Soro polivalente para *salmonella*

Plasma de coelho

Eosina

Nujol

Meios de cultura

## 8.3. Secretaria de Vigilância Sanitária Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997

Dispõe sobre:

Art. 1º – Aprovar o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos.

O anexo a seguir lista os limites de tolerância para as diferentes classes de produtos que podem ser relacionadas ao presente trabalho.

Grupo de alimentos	<i>Salmonella</i> (ausência em)	Coliformes Fecais	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Bolores e leveduras
Amidos, farinhas, féculas e fubás	25g.	10/g	$5 \times 10^2/g$	$10^3/g$	$10^4/g$
Massas alimentícias secas com ou sem ovos e sem recheio	25g	10/g	$10^3/g$	$10^3/g$	$10^4/g$
Misturas em pó com ou sem ovos para bolos, tortas, pizzas, etc...	25g	$5 \times 10/g$	$10^3/g$	$10^3/g$	$10^4/g$

## 9. Referências bibliográficas

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1987). *NBR 10.004 Resíduos Sólidos*. Rio de Janeiro. ABNT.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1987). *NBR 10.007 Amostragem de resíduos*. Rio de Janeiro. ABNT.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1987). *NBR 10.006 Solubilização de resíduos*. Rio de Janeiro. ABNT.
- BARON, J.E. *et al* (1990). *Diagnostic microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri. C. V. Mosby Company.
- BRASIL. (1990).. Centro de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, Portaria CVS-1406 abr. Brasília, DF Seção I, p.10.
- BRASIL (1991) Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Diário Oficial da União* Portaria n° 108, 04 set. Brasília, DF.
- BRASIL (1997) Secretaria de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União* Portaria n° 451, 19 de set. Brasília DF
- BROCK, T.D. *et al* (1994). *Biology of microorganisms*. 7<sup>th</sup> ed. New Jersey. A Simon & Schuster Company.
- BURNETT, W.G. *et al*. (1978). *Microbiologia oral e doenças infecciosas*. Rio de Janeiro. 4ed. Guanabara Koogan S.A.

- BUSCHINELLI, C.C.A. (1992) *Impacto ambiental dos reisduos agropecuários e agroindustriais na alimentação animal*. In: Simpósio UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E RESÍDUOS DE COLHEITA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES. São Carlos. *Anais*.São Carlos, EMBRAPA, p.45-67.
- CALDERONI, S. (1997) *Os bilhões perdidos no lixo*. São Paulo, 1ed. Humanitas Editora FFLCH/ USP.
- CASTRO, M.C.A.A. (1996). *Avaliação da eficiência das operações unitárias de uma usina de reciclagem e compostagem na recuperação dos materiais recicláveis e na transformação da matéria orgânica em composto*.São Carlos. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CEMPRE, Compromisso Empresarial Para Reciclagem (1995). *Lixo Municipal – Manual de Gerenciamento*.IPT, Instituto de Pesquisas Tecnológicas. São Paulo.
- CLAUS, G.W. (1989). *A Laboratory Textbook for Microbiology*. W. H. Freeman and Company. New York.
- COLLINS C.H., (1995). *Microbiological Methods*.Butterworth-Heinemann. Great Britain.
- CURTIS, G.D.W. & BEUCHAT, L.R. (1998). *Quality control of culture media – perspectives and problems*. International journal of microbiology. V45 p. 3-6. Georgia. USA.
- DIÁRIO OFICIAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (1<sup>o</sup> de abril de 1998) v. 108 n<sup>o</sup> 62, pag. 1 – 43, seção 1 suplemento.

- EIGNHEER, E. M. (1998). *Coleta Seletiva de Lixo – Experiências Brasileiras*. Rio de Janeiro. CIRS – Centro de Informação Sobre Resíduos Sólidos. Universidade Federal Fluminense.
- FRANCO, B. D. G. M. (1989). *Análise microbiológica de misturas prontas destinadas ao tempero de alimentos (tempero pronto)*. Revista de Microbiologia. V. 20, nº 3, p. 272-277. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo.
- FRANCO, B. D. G. M. (1996). *Microbiologia dos alimentos*. Atheneu. São Paulo.
- GERMER, S.P.M. *et al* (1995) *Princípios de esterilização de alimentos*. Manual técnico nº 10, ITAL, Campinas.
- HARRIGAN, W.F. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology.*, 2ªed. Academic Press. England
- HOLT, J.G. & KRIEG, N.R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins. USA
- HUGHES, J., (2000). O Futuro já Começou. *Correio Brasiliense*. Brasília, 2 de janeiro de 2000. Caderno Mundo. p. 5.
- KIEHL, E.J. (1985). *Fertilizantes Orgânicos*. São Paulo. Agronômica Ceres.
- LADISLAU. J.B., (1995) *Aspectos Epidemiológicos e Alternativas para o Gerenciamento de Serviços de Saúde*. Seminário realizado no Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC/ Universidade de São Paulo. São Carlos.
- LIMA, L.M.Q. (1991). *Tratamento de lixo*. 2ed., Hemus. São Paulo.
- MERCK, (sem data). *Manual de Microbiologia, Meios de Cultivo e Outros Produtos para Microbiologia*. Ed. Merck R. F. da Alemanha.

- MORTATTI, M. P. L., *et al.* *Avaliação microbiológica de doces cremosos comercializados na cidade de Araraquara*. Alimentos e nutrição. Universidade Estadual do Paulista UNESP. V 04 São Paulo.
- MOSSEL, D. A. A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. (1967). *Enumeration of Bacillus cereus in foods*. Appl. Microbiol. V. 15 p. 650-653.
- NADER, A. F. & ITURRINO, S.R.P. (1989). *Avaliação das características microbiológicas do leite tipo "C" e das embalagens plásticas utilizadas no envase, em uma usina de beneficiamento do estado de São Paulo, Brasil*. Resvista de Microbiologia. V. 20, nº 3, p. 261-263. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo.
- PELCKZAR, M.J. (1981). *Microbiologia*. São Paulo. McGrall-Hill do Brasil.
- PESSOA, G.V. & SILVA, E.A.M.(1974). *Mileu pour la identificacion presuntive rapide de enterobactéries, des Aeromonas et vibrions*. Ann. Microbiol., V. 125, p. 341-347. France.
- SCHAUCH,V.(1990). *Curso Sobre Gerenciamento de Resíduos Sólidos*.ABES. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. São Paulo.
- SCHAUCH,V. (1992). *Análise comparativa do comportamento de dois aterros sanitários semelhantes e correlações dos parâmetros do processo de digestão anaeróbica*.Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- SCHWARTZ, L.D. (1974) *Manual de sanidad avícola* México. Union Tipográfica Editorial Hispano-Americana.

- SILVA, J.A. *et. al.* (1993). *Avaliação microbiológica de mortadelas formuladas com matérias-primas vegetais*. Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos da Universidade Federal do Pará. V11 n<sup>o</sup> 01 Curitiba.
- SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G.(1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins. USA.
- SOBRAL, H.R. (1996). *O meio ambiente e a cidade de São Paulo* São Paulo, Makron Books. Cap. 4, p.55-75.
- VIANA, E. (1999). *Resíduos Alimentícios do Lixo Domiciliar: Coleta, Processamento Caracterização, e Avaliação da Viabilidade Nutricional como Ingrediente para Ração de Frangos de Corte*. São Carlos. Tese (doutorado) – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ZANON, U.; NEVES, J. (1987). *Infecções hospitalares*, Editora Medsi, Rio de Janeiro.