



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

BIOFILMES DE *PSEUDOMONAS* SPP. E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM AÇO INOXIDÁVEL E SUA BIOTRANSFERÊNCIA PARA O LEITE

A. D. B. Guimarães¹, L. L. R. Borges², E. R. Gomes³, R. S. Souza⁴, P. S. Cunha⁵, R. T. Careli⁶

1 – Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias – CEP: 39404-547 – Montes Claros – MG – Brasil, Telefone: (38) 98405-6658 – e-mail: aleciabarros@live.com

2 – Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias – CEP: 39404-547 – Montes Claros – MG – Brasil, Telefone: (38) 99133-9992 – e-mail: larissalrb@hotmail.com

3 – Engenheira de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias – CEP: 39404-547 – Montes Claros – MG – Brasil, Telefone: (38) 99814-5943 – e-mail: elisangelaramieres@yahoo.com.br

4 – Engenheira de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias – CEP: 39404-547 – Montes Claros – MG – Brasil, Telefone: (38) 99112-3643 – e-mail: renatta_3@hotmail.com

5 – Engenheira de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias – CEP: 39404-547 – Montes Claros – MG – Brasil, Telefone: (38) 99862-8740 – e-mail: priscila_cunha@hotmail.com.br

6 – Docente, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias – CEP: 39404-547 – Montes Claros – MG – Brasil, (38) 2101-7723 – e-mail: robertacareli@ufmg.br

RESUMO – Com essa pesquisa objetivou-se avaliar o potencial de biotransferência e a adesão bacteriana de estirpes de *Pseudomonas* spp. e de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável em leite desnatado. Culturas ativas das estirpes foram inoculadas no leite para o estudo de adesão bacteriana através da adição de quatro cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 e do potencial de biotransferência a partir das células aderidas aos cupons para o leite desnatado sem inoculação. Os resultados encontrados para biotransferência mostraram desprendimento das células aderidas aos cupons de aço inoxidável para o leite acima de $7,23 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Além disso, verificou-se uma maior capacidade de adesão e formação de biofilmes das estirpes de *S. aureus* em comparação as estirpes de *Pseudomonas*. O controle da adesão inicial é crucial na inibição da formação de biofilme, para isso, é necessária a utilização de procedimentos de higienização adequados e eficientes.

ABSTRACT – This research aimed to evaluate the biotransfer potential and bacterial adhesion of *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* strains on stainless steel surfaces in skimmed milk. Active cultures of the strains were inoculated in milk for the study of bacterial adhesion through addition of four stainless steel coupons (AISI 304 # 4), and the biotransfer potential from the cells adhered to the coupons to skimmed milk not inoculated. The results for biotransfer showed detachment above $7.23 \log \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ of cells attached to stainless steel coupons to the milk. In addition, there was a greater adhesion ability and biofilm formation of the strains of *S. aureus* compared with strains of *Pseudomonas*. The control of the initial adhesion is critical in inhibiting biofilm formation, so it is necessary to use appropriate and efficient sanitizing procedures.

PALAVRAS-CHAVE: Patógenos, leite mastítico, adesão bacteriana.



KEYWORDS: pathogens, mastitic milk, bacterial adhesion.

1. INTRODUÇÃO

Os biofilmes são comunidades de microrganismos que se desenvolvem em superfícies de ambientes diversos. Podem ser definidos como formas de existência microbiana espacialmente e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes e substâncias poliméricas extracelulares (Nicolaev e Plakunov, 2007).

Estas estruturas naturalmente ocorrem em variados tipos de ambientes. Pesquisas sobre a sua formação em superfícies utilizadas na produção de alimentos, como aço inoxidável vêm recebendo destaque, principalmente no que se refere aos malefícios de sua presença. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, como por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp., podendo comprometer, assim, a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (Fuster-Valls et al., 2008 apud Boari et al., 2009). As negatividades de sua ocorrência também se relacionam à corrosão de equipamentos e pela redução da capacidade da troca de calor entre superfícies (Mansfeld, 2007).

O potencial de biotransferência indica a quantidade de células aderidas do microrganismo à superfície que pode ser despreendida para o meio onde se encontra. Isso pode levar problemas para as indústrias de alimentos, principalmente para os laticínios, uma vez que pode ocorrer a recontaminação do leite, que pode causar sérios prejuízos econômicos e de saúde pública (Oliveira, et al., 2010).

Os alimentos podem ser considerados veículos de disseminação de microrganismos, os quais podem ser responsáveis pela diminuição da vida de prateleira desses produtos. Dentre os microrganismos causadores de doenças e problemas de deterioração de alimentos destaca-se *Pseudomonas* spp. As espécies pertencentes a esse gênero caracterizam-se por serem bastonetes gram-negativo, ubíquos de vida livre encontrados em ambientes úmidos como água, solo, plantas, detritos e no leite (Torres et al., 2006). *Pseudomonas* spp. são, geralmente, representadas por mais de 10% da microflora extraída do leite, contudo, são os mais importantes psicotróficos que dominam a microflora do leite cru e pasteurizado no tempo de deterioração (Caixeta, 2008).

Staphylococcus aureus é um microrganismo gram-positivo, mesófilo, entretanto pode crescer em ampla faixa de temperaturas. Esse microrganismo forma biofilme facilmente sobre superfícies bióticas e abióticas e é encontrado com alta frequência em leite e superfícies que entram em contato com o leite (Millezi, 2012).

Com essa pesquisa objetivou-se avaliar o potencial de biotransferência e adesão de estirpes de *Pseudomonas* spp. e de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável em leite desnatado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os microrganismos avaliados neste trabalho foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas* spp. isolada de leite de vaca com mastite, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* isolado de leite de vaca com mastite. Para o estudo de adesão bacteriana, culturas bacterianas ativas foram centrifugadas a 9000 x g por 10 min e os *pellets* foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,85 %. As suspensões bacterianas foram preparadas por ressuspensão



dos *pellets* em água peptonada a 0,1 % e inoculada em *Erlenmeyers* com 99 mL de leite desnatado esterilizado de modo a obter uma concentração celular de 10^5 UFC·mL⁻¹, para cada sistema experimental. Em cada *Erlenmeyer* foram adicionados quatro cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 com dimensões de 2 cm x 2 cm x 0,1 cm, previamente higienizados e esterilizados de acordo com Rossoni e Gaylarde (2000). A superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 foi escolhida por ser a mais empregada em tanques de expansão de leite (Hood e Zottola, 1997).

Esse sistema experimental foi mantido sob agitação constante em mesa agitadora orbital a 60 rpm de modo a simular a agitação do leite no tanque de expansão. Os cupons foram rinsados com água destilada e transferidos para uma nova amostra de leite desnatado esterilizado sem inoculação após 24 h de condução do sistema experimental. Esse novo sistema foi mantido sob agitação de 60 rpm por mais 24 h, totalizando 48 h de adesão bacteriana. Esse período foi dimensionado com base na legislação vigente para qualidade do leite cru, que estabelece como tempo máximo entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento onde será processado (Brasil, 2011). Para avaliação do potencial de biotransferência das células aderidas aos cupons para o leite desnatado sem inoculação, alíquotas de 1000 µL foram retiradas e submetidas a diluições decimais seriadas sucessivas seguidas de plaqueamento em Ágar Cetrimide ou Ágar Baird Parker, para quantificação de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente, a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 24 h (Boari et al., 2009 com adaptações).

Para quantificação das células bacterianas aderidas, os cupons foram retirados, rinsados por 1 min em 10 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85 % para retirada de células planctônicas, transferidos para 10 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85 % e submetidos a ultrassom por 2 min para desprendimento das células sésseis. Realizaram-se diluições decimais de cada amostra, com plaqueamento em Ágar Cetrimide ou Ágar Baird Parker a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 24 h. E os resultados foram expressos em UFC·cm⁻².

Esse experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Todas as análises estatísticas foram realizadas a 5 % de probabilidade pelo teste F utilizando o Sistema de Análises Estatísticas – SAS (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1 os resultados encontrados para biotransferência mostraram um elevado desprendimento das células aderidas aos cupons de aço inoxidável para o leite. As estirpes padrão de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e o isolado *Pseudomonas* spp. apresentaram maior capacidade de desprendimento para o leite ($P > 0,05$), quando comparadas com as estirpes de *S. aureus* isoladas. Esses dados são preocupantes uma vez que, o desprendimento das células é uma fonte constante de contaminação do microrganismo no alimento. A partir dos resultados obtidos fica comprovado que as células bacterianas que não forem retiradas da superfície de aço inoxidável durante a higienização podem contaminar o leite.

Tabela 1 - Potencial de biotransferência de estirpes de *Pseudomonas* e de *Staphylococcus aureus* após 24 h e adesão bacteriana em superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 após 48 h em leite desnatado.

Estirpes	Biotransferência (Log UFC·mL ⁻¹)	Adesão (Log UFC·cm ⁻²)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8,16 a	3,84 b
<i>Pseudomonas</i> spp. Isolada	8,05 a	3,24 b



<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8,10 a	7,00 a
<i>S. aureus</i> isolado	7,23 b	7,12 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.
Fonte: Próprio autor

Os resultados da quantificação de células aderidas na superfície de aço inoxidável após 48 h estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se uma maior capacidade de adesão das estirpes de *S. aureus* em comparação as estirpes de *Pseudomonas* ($P < 0,05$). Segundo Andrade et al. (1998), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 10^7 UFC·cm⁻² de superfície. Dessa forma, constatou-se que as estirpes de *S. aureus* padrão e isolada foram capazes de formar biofilmes. Apesar da ausência de formação de biofilmes pelas estirpes de *P. aeruginosa* não se pode menosprezar os malefícios do processo de adesão ocorrido, visto que bactérias pertencentes a este gênero são capazes de deteriorar o leite devido à produção de lipases e proteases.

A ausência de formação de biofilmes por *Pseudomonas* encontrada no presente trabalho pode ser decorrente do tempo de incubação utilizado, que foi de 48 h. Uma vez que, em uma pesquisa realizada por Caixeta (2008), foi observada a formação de biofilmes em aço inoxidável por *P. aeruginosa* cultivada em leite desnatado reconstituído a 28 °C por 10 dias. Porém quando incubada a 7 °C por 10 dias essa bactéria não foi capaz de formar biofilme, tendo sido encontrada a adesão de 3,9 Log UFC.cm⁻².

Existem na literatura poucos dados disponíveis sobre a adesão e formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, oriundos de circuitos de beneficiamento de leite, sob superfícies de aço inoxidável, o que dificulta a comparação dos dados obtidos nessa pesquisa.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram elevado desprendimento das células aderidas aos cupons de aço inoxidável para o leite, sendo assim é necessária a aplicação de métodos de higienização eficientes das superfícies de processamento como as de aço inoxidável para evitar a contaminação do leite. Verificou-se também altos valores de adesão bacteriana nas superfícies, sendo que as estirpes de *S. aureus* apresentaram uma maior capacidade de adesão e foi capaz de formar biofilmes, o que não aconteceu com as estirpes de *Pseudomonas*. Dessa forma, para evitar o comprometimento da qualidade do leite e demais alimentos, o controle da adesão inicial é crucial na inibição da formação de biofilme, para isso, é necessária a utilização de sanitizantes adequados e eficientes.

5. AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

Andrade, N. J., Bridgman, T. A., Zottola, E. A. (1998) Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*, 61(7), 833-838. Disponível em <http://www.ingentaconnect.com/contentone/iafp/jfp/1998/00000061/00000007/art00010?crawler=true>

Boari, C. A., Alves, M. P., Tebaldi, V. M. R., Savian, T. V., Piccoli, R. H. (2009). Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (4), 886-895. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/29.pdf>.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2011). *Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel* (Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Caixeta, D. S. (2008). *Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Fuster-Valls, N., Hernández-Herrero, M., Marín-de-Mateo, M., Rodríguez-Jerez, J. J. (2008). Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, 19 (3), 308-314. Disponível em http://ac.els-cdn.com/S0956713507000795/1-s2.0-S0956713507000795-main.pdf?_tid=b325fd60-31d2-11e6-a877-00000aacb35d&acdnat=1465869350_52113343404894fd764cc361924160ad

Hood, S. K., Zottola, E. A. (1997). Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 60 (9), 1034-1037. Disponível em <http://www.ingentaconnect.com/contentone/iafp/jfp/1997/00000060/00000009/art00004?crawler=true>

Mansfeld, F. (2007). The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochimica Acta*, 52(2), 7670-7680.

Millezi, A. F. (2012). *Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por Staphylococcus aureus e Escherichia coli* (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Nikolaev, Y. A., Plakunov, V. K. (2007). Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms?. *Microbiology*, 76 (2), 125-138. Disponível em <http://link.springer.com/article /10.1134%2FS0026261707020014#page-1>.

Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., Piccoli R. H. (2010) Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 69 (3), 277-84. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v69n3/v69n3a01.pdf>

Rossoni, E. M. M., Gaylarde, C.C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

International Journal of Food Microbiology, 61(1), 81-85. Disponível em http://ac.els-cdn.com/S016816050000369X/1-s2.0-S016816050000369X-main.pdf?_tid=1e2a44a8-31d4-11e6-b2ae-00000aacb360&acdnat=1465869959_415c69092e4573572f1c3d7346d3503d

Torres, J. C. N., Menezes, E. A., Ângelo, M. R. F., Oliveira, I. R. N., Salviano, M. N. C., Xavier, D. E., Filho Santos, L. (2006). Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42 (5), 313-318. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n5/a03v42n5.pdf>