

BIOFILMES DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA E SUA BIOTRANSFERÊNCIA DE AÇO INOXIDÁVEL PARA O LEITE

BIOFILMS OF BOVINE MASTITIS BACTERIA AND ITS BIOTRANFERENCE FROM STAINLESS STEEL TO MILK

Alécia Daila Barros Guimarães¹, Larissa Lorrane Rodrigues Borges¹, Adriana Gonçalves Freitas¹, Roberta Torres Careli², Eduardo Robson Duarte²

¹ Graduandas em Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

² Docentes, Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

Resumo

Objetivou-se avaliar a biotransferência de isolados de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus* para o leite após a sua adesão em superfícies de aço inoxidável. Culturas ativas das cepas foram inoculadas em leite para o estudo de adesão bacteriana em aço inoxidável por 48 h. A biotransferência das células aderidas para o leite foi avaliada após 24 h. Observou-se a formação de biofilmes pelos isolados de *S. aureus*, com contagens superiores a 7,0 Log UFC·cm⁻². A adesão dos isolados de *E. coli* atingiram, no máximo, 5,65 Log UFC·cm⁻². Para todos os isolados, houve desprendimento das células do aço para o leite, o qual atingiu concentração mínima de 7,62 log UFC·mL⁻¹. 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.

Palavras-chave: Patógenos, mastite subclínica, adesão bacteriana

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 (NIKOLAEV e PLAKUNOV, 2007).

Essas 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, como por exemplo, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, podendo comprometer, assim, a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (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 desprendida 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).

O leite e os equipamentos envolvidos em seu processamento podem ser considerados veículos de disseminação de microrganismos, os quais podem ser responsáveis pela diminuição da vida de prateleira de seus derivados. Dentre os microrganismos causadores de doenças destacam-se *E. coli* e *S. aureus*. Os sorotipos e espécies pertencentes a esses gêneros caracterizam-se por serem ubíquos, de vida livre encontrados em leite proveniente de vacas com mastite subclínica e clínica (FREITAS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2006).

Segundo Ribeiro et al. (2006), *E. coli* é um dos mais prevalentes microrganismos de origem ambiental, na gênese da mastite bovina. Dentre os patógenos contagiosos, *S.*

Trabalhos Apresentados

aureus é o mais frequente nos casos de mastite bovina. Possui vários fatores de virulência que contribui para sua persistência no tecido mamário e, embora medidas preventivas que visam o controle das mastites sejam amplamente praticadas, as mastites causadas por este patógeno ainda são bastante comuns. Além disso, as mastites adquirem importância para a saúde pública pela possibilidade de veiculação de microrganismos, toxinas e resíduos de antimicrobianos no leite (FREITAS et al, 2005).

Diante disso, objetivou-se avaliar a biotransferência de isolados de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus* para o leite após a sua adesão em superfícies de aço inoxidável.

Material e métodos

As cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram isoladas de vacas com mastite subclínica e fazem parte da bacterioteca do laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. Ao todo, foram avaliadas duas cepas de *E. coli* (EC21 e EC25) e duas cepas de *S. aureus* (SA13 e SA17). Para o estudo de adesão bacteriana, as culturas 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 10⁵ 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 Mac Conkey ou Ágar Baird Parker, para quantificação de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, a 37 °C ± 2 °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 Mac Conkey ou Ágar Baird Parker a 37 °C ± 2 °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).

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. Os isolados EC21, EC25 e SA13 apresentaram maior capacidade de desprendimento para o leite, quando comparados com o isolado SA17 (P<0,05). Esses dados são preocupantes uma vez que, o desprendimento das células é uma fonte constante

Trabalhos Apresentados

de contaminação do microrganismo no alimento. A partir dos resultados obtidos nas análises de biotransferência, comprova-se 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 cepas isoladas de *Escherichia coli* (EC21 e EC25) e de *Staphylococcus aureus* (SA13 e SA17), expresso em Log UFC·mL⁻¹, após 24 h e adesão bacteriana em superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, expressa em Log UFC·cm⁻², por 48 h em leite desnatado

Isolados bacterianos	Biotransferência (Log UFC·mL ⁻¹)	Adesão (Log UFC·cm ⁻²)
EC21	8,49 a	5,65 b
EC25	8,53 a	5,26 b
SA13	8,55 a	7,32 a
SA17	7,62 b	7,15 a

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

Os resultados da quantificação de células aderidas na superfície de aço inoxidável após contato de 48 h estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se uma maior capacidade de adesão das cepas de *S. aureus* em comparação as cepas de *E. coli* ($P < 0,05$). Segundo Andrade et al. (2008), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 10^7 UFC·cm⁻² de superfície. Dessa forma, constatou-se que os isolados SA13 e SA17 foram capazes de formar biofilmes. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos, podendo comprometer, assim, a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (FUSTER-VALLS et al., 2008).

Lima et al. (2015) encontraram valores médios de células aderidas de *E. coli* produtora de toxina Shiga em aço inoxidável variando de 5,90 a 6,04 Log UFC·cm⁻² após 48 h de contato. Esses resultados confirmam o grau de adesão encontrado no presente estudo. Apesar da capacidade de adesão menor das cepas de *E. coli*, não se pode menosprezar os malefícios do processo aderência ocorrido, visto que bactérias pertencentes a este gênero são capazes de provocar doenças a pessoas que ingerirem o leite contaminado com os números de células encontradas.

Conclusão

Houve desprendimento elevado 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 cepas de *S. aureus* apresentaram uma maior capacidade de adesão e foram capazes de formar biofilmes, o que não aconteceu com as cepas de *E. coli*. O controle da adesão inicial é importante na inibição da formação de biofilme para evitar o comprometimento da qualidade do leite e seus derivados. Para isso, é necessária a implantação de protocolos de higienização adequados e eficientes.

Agradecimentos: FAPEMIG, CNPq, PRPq/UFMG

Referências bibliográficas

- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. Editora Varela, 2008, 412 p.
- BOARI, C. A., ALVES, M. P., TEBALDI, V. M. R., SAVIAN, T. V., PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 886-895, 2009.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 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. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF**, Disponível em: <<http://www.apcbrh.com.br/files/IN62.pdf>> Acesso em: 01 out. 2016
- FREITAS, M. F. L., PINHEIRO JÚNIOR, J. W., STAMFORD, T. L. M., RABELO, S. S. A., SILVA, D. R., SILVEIRA FILHO, V. M., SANTOS, F. G. B., SENA, M. J., MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, p.171-177, 2005.
- FUSTER-VALLS, N., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., MARÍN-DE-MATEO, M., RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, p. 308-314, 2008.
- HOOD, S. K., ZOTTOLA, E. A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1034-1037, 1997.
- LIMA, P. G., CABRAL, J. P. G., SILVA, T. M., ESPER, L. M. R., GONZALEZ, A. G. M., FRANCO, R. M. Formação de biofilmes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 em superfície de aço inoxidável e eficácia de sanitizante. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, p. 134-139, 2015.
- MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 7670-7680, 2007.
- NIKOLAEV, Y. A., PLAKUNOV, V. K. Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, p. 125-138, 2007.
- OLIVEIRA, M. M. M., BRUGNERA, D. F., PICCOLI R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 277-284, 2010.
- RIBEIRO, M. G., COSTA, E. O., LEITE, D. S., LANGONIL, H., GARINO JÚNIOR, C., VICTÓRIA, C., LISTONI, F. J. P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p.724-731, 2006.
- ROSSONI, E. M. M., GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.
- SAS Institute. SAS/ETS user’s guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute, 2010.

Autor a ser contatado: Roberta Torres Careli, Docente do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, Av. Universitária, n. 1000, Universitário, Montes Claros/MG – robertacareli@ufmg.br