

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE SUÍNOS APÓS ESTRESSE SUBLETAL

JULIA ROSIN DA SILVA¹; LAUREN MACHADO MOREIRA²; CLÁUDIO DIAS TIMM³

¹Universidade Federal de Pelotas – julia_rosin@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lauren_moreira@yahoo.com

³Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus spp. são micro-organismos que podem estar presentes na água, solo, trato respiratório, pele e transitoriamente no trato gastrointestinal do homem e de outros animais, incluindo os suínos (JAY, 2000). Podem ser caracterizados como coagulase negativa ou positiva, de acordo com a capacidade de produzir a enzima coagulase e converter o fibrinogênio em fibrina, evitando a ação fagocitária no local de infecção (QUINN, 2011; HENNEKINNE et al., 2012). A produção da enzima coagulase está estritamente relacionada com a produção de enterotoxinas (JAY, 2000; QUINN, 2005).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas e constituem um grave problema de saúde pública (BRASIL, 2001). *Staphylococcus aureus* é a espécie mais frequentemente associada a surtos de intoxicação alimentar, devido a capacidade de várias cepas produzirem enterotoxinas (GERMANO; GERMANO, 2015).

S. aureus apresenta capacidade de formar biofilme nas superfícies orgânicas, como mucosas de vários tecidos, e inorgânicas (HONARY et al., 2014), como em diferentes superfícies utilizadas em indústrias de alimentos (SANTOS, 2009; LEE et al., 2014; COSTA et al., 2016). O biofilme bacteriano é uma comunidade de micro-organismos sésseis embebidos em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos, que são capazes de se aderir a uma superfície formando uma camada espessa, na qual os micro-organismos continuam a se multiplicar (PARIZZI, 1998; DONLAN; COSTERTON, 2002). Condições intrínsecas do alimento como pH, salinidade, atividade de água, bem como fatores ambientais, dentre eles umidade e temperatura de refrigeração, podem influenciar na permanência do micro-organismo no alimento. Além disso, essas condições podem resultar na formação de biofilme, devido a exposição da bactéria a fatores de estresse (JEFFERSON, 2004). Portanto, mostra-se importante o conhecimento a respeito da influencia dessas condições intrínsecas e extrínsecas na capacidade microbiana de formar biofilme.

O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos de diferentes tipos de estresse subletal na formação de biofilme por *S. aureus* isolados de suíno.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados seis isolados de *S. aureus* previamente obtidos de suínos por MOREIRA et al. (2017) e já classificados quanto à capacidade de formação de biofilme, sendo três não formadores e três fortes formadores de biofilme.

Os isolados foram submetidos a diferentes tipos de estresse subletal. Para exposição das células ao choque de calor, culturas *overnight* em Caldo Triptona

de Soja (TSB, Acumedia, EUA) foram mantidas em banho-maria a 42°C por 45 min, segundo CHANG et al. (2004). Para exposição ao choque de frio, culturas *overnight* em TSB foram mantidas a 4°C durante 4 h. Os procedimentos descritos por WONG et al. (1998) foram utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em TSB tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e foram incubadas a 37°C durante 30 min. As células também foram estressadas em ambiente salino. Culturas *overnight* em TSB foram submetidas a concentração de 5% de NaCl.

Após a indução ao estresse subletal, os isolados foram testados quanto à capacidade de formação de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica descrita por JANSSENS et al. (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *S. aureus*. Foram colocados 200 µL de TSB em cada poço da placa de microtitulação, adicionados de 2 µL de culturas *overnight* em TSB de cada isolado padronizados em espectrofotômetro a 600 nm para 0,5 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo TSB, sem cultura bacteriana foram utilizados como controle. Então, a tampa contendo vilosidades foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C, sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes se formaram sobre as vilosidades das tampas. Para quantificação da formação de biofilmes, as tampas foram lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material que permaneceu ligado à tampa foi corado durante 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa foi secada em temperatura ambiente por 30 min. O biofilme com o corante ligado foi extraído com ácido acético glacial 30% (200 µL) e a DO₅₇₀ de cada poço foi medida. Cada isolado foi classificado como não formador de biofilme, fracamente formador, moderadamente formador ou fortemente formador, de acordo com os procedimentos sugeridos por STEPANOVIC et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles e a classificação foi determinada como não formador: DO ≤ DOc; fraco formador: DOc < DO ≤ 2 x DOc; moderado formador: 2 x DOc < DO ≤ 4 x DOc; forte formador: 4 x DOc < DO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após serem submetidos ao estresse subletal, a maioria dos isolados classificados previamente como fortes formadores de biofilme mantiveram essa capacidade (Tabela 1). Já em relação aos isolados considerados não formadores de biofilme, após serem estressados, apenas um manteve-se inalterado. Os outros dois isolados não formadores de biofilme tornaram-se fracos formadores na maioria dos estresses aos quais foram submetidos, exceto um dos isolados, o qual passou a ser moderado formador de biofilme quando exposto ao estresse pelo calor e salinidade, indicando que o estresse subletal é capaz de modificar consideravelmente a capacidade de *S. aureus* formar biofilme.

Tabela 1 – Capacidade de formação de biofilme por isolados de *S. aureus* após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal.

Isolados	Calor	Frio	pH ácido	Salinidade
Fortes formadores				
1	Forte	Forte	Forte	Moderado*
2	Forte	Forte	Forte	Moderado*
3	Forte	Forte	Forte	Forte
Não formadores				
4	Moderado*	Fraco*	Fraco*	Moderado*
5	Não	Não	Não	Não
6	Fraco*	Fraco*	Não	Fraco*

*Isolados que alteraram sua capacidade de formar biofilme após exposição ao estresse subletal.

Pôde-se observar que os isolados se comportaram de maneiras distintas em relação a formação de biofilme quando submetidos a diferentes formas de estresse subletal. Alguns tipos de estresse influenciaram a capacidade do isolado de formar biofilme, favorecendo expressivamente ou não a sua formação, dependendo do isolado e do estresse ao qual foi exposto.

Segundo RODE et al. (2007), a formação de biofilme por *S. aureus* é pequena a 42°C quando exposta a diferentes tempos de incubação, porém, os resultados do presente estudo indicam que, no geral, houve um aumento da formação de biofilme por isolados previamente considerados não formadores quando submetidos a 42°C por 45 min. Ainda, segundo os resultados obtidos por esses autores, a produção de biofilme aumenta na presença combinada de NaCl e glicose, com uma concentração ótima de 1,5 a 6% de cada um destes. Isso está de acordo com o nosso estudo, tendo em vista que a 5% de NaCl a maioria dos isolados que não formavam biofilme passaram a formar.

O estresse subletal, ao induzir a formação de biofilme por isolados de *S. aureus*, pode levar à maior dificuldade de eliminação desse micro-organismo de superfícies, prejudicando a sanitização de equipamentos na indústria de alimentos, onde há exposição a esses estresses. Dessa maneira, *S. aureus* passaria a ser uma potencial fonte de contaminação para os alimentos.

4. CONCLUSÕES

Isolados de *S. aureus* apresentam comportamentos distintos sob condições de estresse subletal. A exposição a diferentes tipos de estresse pode resultar na capacidade de formar biofilme por alguns isolados, mais expressivamente quando submetidos ao calor (42°C) e ambiente salino (5% de NaCl).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.
- CHANG, C. M.; CHIANG, M. L.; CHOU, C. C. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2183-2188, 2004.
- COSTA, K. A. D.; FERENZ, M.; SILVEIRA, S. M.; MILLEZI, A. F. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75-82, 2016.

- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, p. 167-193, 2002.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5. ed. Barueri, 2015, 1077p.
- HENNEKINNE, J.; DE BUYSER, M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.
- HONARY, S.; EBRAHIMI, P.; HADIANAMREI, R. Optimization of particle size encapsulation efficiency of vancomycin nanoparticles by response surface methodology. **Pharmacy Development Technology**, v. 19, p. 987-998, 2014.
- JANSSENS, J. C. A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D.; VERHOEVEN, T. L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; VOS, D. E.; KEERSMAECKER, S. C. J. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6639–6648, 2008.
- JAY, J. M. Modern food microbiology. **An Aspen Publication**, 2000.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm?. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.
- LEE, S. H. I. **Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilme em ambiente de ordenha**. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
- MOREIRA, L. M. **Fontes de contaminação de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate de suínos**. 2017. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. 1998. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. Ed. Artmed: Porto Alegre, 2005, 512p.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.; LEONARD, F.C.; **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2 ed. Iowa: Wiley-blackwell. 2011, 1231p.
- RODE, M. T.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372-383, 2007.
- SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.
- WONG, H. C.; PENG, P. Y.; HAN, J. M.; CHANG, C. Y.; LAN, S. L. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. **Infect and Immun**, v. 66, n. 7, p. 3066-3071, 1998.