

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE SUÍNOS E LEITE

THAÍS GONÇALVES GONÇALVES¹; JULIA ROSIN DA SILVA²; LAUREN
MACHADO MOREIRA²; THAMIRIS PEREIRA DE MORAES²; CLÁUDIO DIAS
TIMM³

¹ Universidade Federal de Pelotas – thais.g@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – julia_rosin@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – lauren_moreira@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – thamiris.p@outlook.com

³ Universidade Federal de Pelotas – timmm@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína de origem animal mais consumida e produzida do mundo (USDA, 2016). Possui elevado valor nutricional, sendo composta por 75% de água, 22,8% de proteínas, 1,2 % de gorduras, 1,0% de minerais, além de ser excelente fonte de magnésio, ferro, potássio, zinco e vitaminas hidrossolúveis do grupo B (ROÇA, 2008), porém esses aspectos também podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. O consumo de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas acarretam Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (MACHADO et al., 2014).

Staphylococcus aureus são agentes responsáveis por intoxicação alimentar, decorrente da ingestão de alimentos contaminados com a enterotoxina estafilocócica pré-formada no alimento. No período entre 2007 a 2017, no Brasil, *S. aureus* foi o terceiro agente mais diagnosticado em surtos de intoxicação alimentar, responsável por 407 casos (BRASIL, 2017).

São bactérias Gram-positivas em forma de cocos, anaeróbias facultativas, coagulase positiva e pertencem à família Micrococcaceae (BOONE et al., 2001). São mesófilas, com crescimento entre 7 a 47 °C, sendo que a faixa de temperatura para produção de enterotoxina está entre 10 a 46 °C (TEIXEIRA, 2013).

De acordo com LEITE (2013), um importante fator de virulência de *Staphylococcus* é a capacidade de formar biofilme. *S. aureus* é uma das espécies patogênicas mais importantes dentre as bactérias Gram positivas que formam biofilme (PARSEK e SENGH, 2002). O biofilme bacteriano é caracterizado como um agregado celular sésil monoespécie ou multiespécie, embebido em uma matriz de exopolissacarídeos (FLEMMING e WOZNIAK, 2007) fixada em superfícies bióticas ou abióticas (DICICCO et al., 2012). Os biofilmes formados representam fonte de contaminação permanente, que facilitam a persistência das bactérias nas plantas industriais, pois se aderem fortemente às superfícies, liberando bactérias do biofilme (JOSEPH et al., 2001), que podem contaminar o alimento, e assim, prejudicar a qualidade do produto final. Além disso, o biofilme atrapalha a ação de agentes físicos e químicos utilizados nos procedimentos de limpeza e sanitização das indústrias (KASNOWSKI et al., 2010).

O presente trabalho teve por objetivo verificar a capacidade de formação de biofilme por cepas de *S. aureus* isoladas de suínos e de leite.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 21 cepas de *S. aureus* previamente isoladas de suínos por MOREIRA et al. (2017), sendo três cepas das pocilgas de espera, quatro cepas do reto, três da superfície externa da carcaça após a escaldagem/depilação, uma da superfície interna da carcaça após a evisceração, duas da superfície da língua, duas da superfície da papada, três da superfície interna dos linfonodos mesentéricos e três da superfície externa da meia-carcaça antes da entrada na câmara fria; e sete cepas isoladas de leite bovino cru por EBERSOL et al. (2017). Os isolados foram analisados quanto à sua capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Dinamarca), 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 Caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia, EUA) em cada poço da placa de microtitulação, adicionados de 2 µL de culturas *overnight* em TSB de cada cepa padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para 0,8 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 cepa foi classificada como não formadora de biofilme, fracamente formadora, moderadamente formadora ou fortemente formadora, 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 conforme segue.

$DO \leq DOc$ = não formadora, $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ = fraca formadora, $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ = moderada formadora e $4 \times DOc < DO$ = forte formadora

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar que 35,71% (10/28) das cepas foram classificadas como fracas formadoras de biofilme. Três (10,71%) cepas foram classificadas como moderadas formadoras, bem como o mesmo valor foi obtido no que se refere às fortes formadoras de biofilme. Já 42,85% (12/28) foram classificadas como não formadoras de biofilme. Das cepas isoladas de suínos, 47,61% (10/21) formaram biofilme, tal como 85,71% (6/7) das cepas isoladas de leite.

Foi constatado que 57,14% (16/28) das cepas formaram biofilme, o que constitui um problema para a indústria, pois o mesmo permite a persistência da bactéria nas plantas industriais que serve como fonte de contaminação para o alimento. Os microrganismos em biofilme tornam-se mais resistentes e são capazes de permanecer nas indústrias após estresse térmico, força mecânica e processos de sanitização (CHAVANT et al., 2007). Ainda, podem perdurar após alterações de pH, choques osmóticos, radiações UV e dessecação (BOARI, 2009). Segundo PHILLIPS et al. (2010), aproximadamente 60% das infecções bacterianas humanas estão associadas à biofilmes bacterianos, o que implica em efeitos negativos tanto no processamento industrial, como na saúde pública.

MELO et al. (2012) verificaram a formação de biofilme por 94 cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite subclínica de dois rebanhos bovinos no

estado de São Paulo, averiguando que 98,9% (93/94) das cepas eram formadoras de biofilme, o que corrobora os resultados do nosso trabalho. Em laticínios, as proteínas, gorduras, açúcares e minerais geram resíduos complexos que dificilmente são eliminados e aderem-se às superfícies (SILVA, 2006), favorecendo a formação de biofilmes. Na China, um trabalho verificou a formação de biofilme por *S. aureus* isolados de um frigorífico de suínos. Os autores observaram que 100% (62/62) das cepas eram formadoras de biofilme (ZHANG et al., 2018), divergindo dos resultados do nosso estudo. Possivelmente, estas diferenças tenham ocorrido uma vez que a produção de biofilme depende da concentração de substrato, presença de enzimas proteolíticas e dos genes associados a formação de biofilme (COELHO et al., 2008). Além disso, de acordo com CHEN et al. (2007), em processamento de carnes, produtos frescos e lácteos, os biofilmes são expostos como problema e, representam mais de 90% dos contaminantes existentes (LUCCHESI, 2006), o que reforça a importância dos resultados obtidos no nosso estudo.

4. CONCLUSÕES

Cepas de *S. aureus* isoladas de suínos e leite apresentam capacidade de formar biofilme, ainda que, a maioria seja fraca formadora.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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* sob diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, 2009.
- BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. **Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology**. Nova York: Springer, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília. 2017. Acessado em 24 Jul. 2018. Online. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>
- CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 3, p. 605-12, 2007.
- CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **Food Science and Technology**, Oxford, n. 40, p. 249-254, 2007.
- COELHO, L.R.; SOUZA, R.R.; FERREIRA, F.A.; GUIMARÃES, M.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. Agr RNAIII regula divergentemente a formação de biofilme induzida por glicose em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v.154, n. 11, p. 3480-3490, 2008.
- DICICCO, M.; NEETHIRAN, S.; SINGH, A.; WEESE, J.S. Efficacy of clarithromycin on biofilm formation of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **BMC Veterinary Research**, v.8, n.1, p. 225-231, 2012.
- EBERSOL, C.N.; MORAES, T.P.; SILVEIRA, D.R.; KAEFER, K.; DIAS, C.T. Isolamento de *Staphylococcus aureus* de leite e fezes de bovinos leiteiros. In: **XXVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 3. Pelotas, 2017. **Anais: Semana Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2017.
- FLEMMING, H.C.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D.J. The EPS Matrix: The house of biofilm cells. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.7945-7947, 2007.

- 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.
- JOSEPH B.; OTTA S.K.; KARUNASAGAR I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, n.3, p. 367-72, 2001.
- KASNOWSKI, M.C.; MANTILLA, S.P.S; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.15, p. 1-23, 2010.
- LEITE, B.A. **Estudo da susceptibilidade e resposta dos biofilmes de estafilococos aos agentes antimicrobianos**. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos- UFSCAR, 2013.
- LUCCHESI, E.G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilms in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.
- MACHADO, L.A.; LUCCA,F.; ALVES, J.; POZZOBON, A.; FILHO, I.C. Prevalence and genotyping of pathogenic *Escherichia coli* on carcasses of pigs slaughtered in commercial slaughterhouses in southern region of Brazil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, n.1, p. 128 – 145, 2014.
- MELO, P. D. C.; FERREIRA, L. M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; GODOY VICENTE, H. I. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, v. 28, n.1, p. 94-99, 2012.
- 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.
- PARSEK, M.R.; SENGH P.K. Bacterial biofilms and emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 677-701, 2002.
- PHILLIPS, P. L.; WOLCOTT, R. D.; FLETCHER, J.; SCHULTZ, G.S. Biofilms Made Easy. **Wounds International**, v. 1, n. 3, 2010.
- ROÇA, R.O. Composição Química da Carne. Botucatu: FCA-UNESP, p.10, 2000.
- SILVA, G.A.V. **Avaliação das condições de obtenção do leite e da ação de sanificantes no tanque de expansão em uma propriedade leiteira no município de Candeias/BA. Salvador – BA: estudo de caso**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.
- 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.
- TEIXEIRA, E. B. **Qualidade microbiológica e padrões físico-Químicos de Salame Colonial na Região de Criciúma/SC**. 2013. 40f. Pós-Graduação Lato Sensu em Controle de Qualidade de Carnes, Leite e Ovos -Universidade Federal de Lavras. Lavras/MG 2013.
- USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Acessado em: 02 agos. 2018. Online. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf
- ZHANG, Y.; XU, D.; SHI, L.; CAI, R.; LI, C.; YAN, H. Association between agr type, virulence factors, biofilm formation and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from pork production. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1876, 2018.