

IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA FORMADORAS DE BIOFILME EM AMBIENTE DE ORDENHA

GUSTAVO FERNANDES DOS SANTOS¹; MILIMANI ANDRETTA²; HELENICE DE LIMA GONZALEZ³; NATACHA DEBONI CERESER⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – gustavof1811@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mili_andretta@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – helenicegonzalez@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – natchacereser@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Biofilme é um conjunto de células sésseis, ligadas entre si e aderidas a algum substrato ou superfície abiótica, que iniciam a produção de substâncias poliméricas extracelulares, com a função de proteger as células das adversidades do ambiente em que está. Assim podem exibir um fenótipo diferente do expresso pelas células planctônicas, com relação à taxa de crescimento e à transcrição de genes que resultam na resistência do biofilme (DONLAN & COSTERTON, 2002). São diversas as vantagens que bactérias crescendo em biofilmes têm em relação à vida planctônica, proteção contra a atuação de antibióticos, desinfetantes e dessecação, sobrevivência à escassez de nutrientes, comunicação intercelular, dentre outras (GARRET et al., 2008).

Bactérias saprófitas e patogênicas são capazes de participar do processo de adesão e de formação de biofilme. Uma vez formados, os biofilmes atuam como pontos de contaminação constante em superfícies de produção de alimentos devido ao desprendimento de células destes micro-organismos. Isso resulta no comprometimento da segurança microbiológica das matérias-primas, bem como dos produtos finais, junto à consequente diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios (FUSTER-VALLS et al., 2008).

O manejo de ordenha é fundamental na qualidade e quantidade do leite produzido, envolvendo fatores de bem estar animal, de saúde de úbere, de higienização na ordenha, e do processo de armazenamento e na conservação do leite. As operações de higienização são frequentemente negligenciadas ou realizadas de forma inadequada e uma higienização inadequada de superfície na linha de produção em laticínios pode levar ao depósito de micro-organismos e à sua aderência, com conseqüente formação de biofilmes (SALUSTIANO, 2007). Baseado no exposto, este trabalho teve por objetivo investigar a capacidade de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de leite e pontos da ordenha formar biofilme.

2. METODOLOGIA

2.1. Isolamento Bacteriano

Foram analisadas 13 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de amostras de leite e de diferentes pontos da ordenha de bovinos, obtidas de uma propriedade rural da região de Pelotas-RS. As coletas foram realizadas durante o acompanhamento da ordenha semanalmente no período de um mês, correspondendo a quatro coletas. O leite de conjunto e os três primeiros jatos de

10% do rebanho foram coletados de forma asséptica. A superfície de equipamentos, utensílios e mãos dos ordenadores foram amostradas conforme APHA (2001).

As amostras foram semeadas em ágar Baird-Parker e cinco colônias de cada tipo (típicas e atípicas) foram selecionadas e semeadas em tubos contendo Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) para serem submetidas ao teste da coagulase em plasma de coelho (BRASIL, 2003). As colônias coagulase positivas foram estocadas em glicerol a -18°C no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), da Faculdade de Veterinária, da UFPel.

2.2. Preparo do Inóculo

Inicialmente, as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva foram semeadas em caldo TSB e incubadas a $37^{\circ}\text{C}/24$ horas. A densidade ótica de cada cultivo foi padronizada ($A_{600\text{nm}}$).

2.3. Ensaio de Formação de Biofilme

O procedimento adotado para realizar este ensaio segue o recomendado por STEENACKERS et al. (2011), com algumas modificações. Inicialmente, foram colocados 200 μL de caldo Trypticase de Soja (TSB, Acumedia) em cada poço de uma placa de 96 cavidades (Nunc, Thermo Scientific, Denmark) adicionados de 8 μL de culturas *overnight* em TSB de cada cepa padronizada em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,9-1,0 de densidade ótica (DO). Poços com 200 μL de caldo TSB, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Então, a tampa foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C sem agitação. Após, as tampas das placas (Nunc-TSP, Thermo Scientific, Denmark) foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (Phosphate Buffered Saline – PBS) e coradas com cristal violeta (isopropanol, metanol e PBS, v/v: 1:1:18) por 30 minutos. Após, estas foram lavadas com água destilada estéril, secas a temperatura ambiente por 30 minutos e colocadas em ácido acético a 30%. Esta última etapa é realizada para que o biofilme formado na tampa se solte e fique no meio. Após a remoção da tampa, a leitura por densidade ótica utilizando um espectrofotômetro foi realizada, utilizando um comprimento de onda de 600nm e de 570nm. O caldo TSB estéril foi utilizado como controle negativo e o controle positivo foi uma cepa de *Staphylococcus* coagulase positiva fortemente formadora de biofilme. Os valores da densidade ótica foram tomados como a média das leituras. A partir, as cepas foram classificadas segundo a aderência na tampa da placa e foram divididas em quatro categorias. Como o experimento foi realizado em triplicata, os resultados foram expressos pela média dos valores obtidos e cada cepa foi agrupada nas quatro categorias selecionada segundo o estipulado por STEPANOVIC et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das densidades óticas (Dos) dos controles e a classificação foi determinada conforme segue.

$\text{DO} \leq \text{DOc}$ = não formadora;

$\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$ = fraca formadora;

$2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$ = moderada formadora;

$4 \times \text{DOc} < \text{DO}$ = forte formadora.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 13 cepas de *Staphylococcus* analisadas, todas (100%) formaram biofilme, sendo 10 (76,9%) consideradas fortes formadoras, duas (15,4%) moderadamente formadoras e uma (7,7%) fraca formadora, conforme pode ser observado na Tabela 1. Os resultados encontrados neste trabalho foram similares aos obtidos por MELO (2011), que verificou que 84% dos isolados de *Staphylococcus* de leite de vacas e do leite obtido do tanque de expansão foram capazes de produzir biofilme “*in vitro*”, sendo que 16% dos isolados testados não formaram biofilme, enquanto que 108 de 127 (85%) dos isolados obtidos do ambiente de ordenha foram produtores de biofilme. GUIMARÃES et al. (2012), avaliaram a formação de biofilme em isolados de *Staphylococcus* obtidos de casos de mastite de bovinos e bubalinos e verificaram que das amostras bovinas analisadas, 17 (56,7%) foram classificadas como não formadoras de biofilme, 10 (33,3%) fracamente formadoras e três (10,0%) fortemente formadoras, totalizando 13 (43,3%) isolados produtores de biofilme.

A diferença encontrada nos resultados pode estar associada à subjetividade dos ensaios fenotípicos, tendo em vista que a produção *in vitro* de biofilme pode ser influenciada por diferentes condições de crescimento e mecanismos de aderência (OLIVEIRA et al., 2006), assim como o ponto de corte utilizado para classificar as cepas testadas nas diferentes categorias utilizadas. No trabalho de STEPANOVIC et al. (2004), a média da densidade ótica obtida em todas as cepas analisadas foi de 0,297, sendo esta inferior a utilizada neste experimento. O ponto de corte utilizado para classificar uma cepa fortemente, moderadamente, fracamente e não formadora de biofilme foi obtido a partir da média da densidade ótica de três valores superior a 0,473, do intervalo de 0,237 - 0,473, 0,118 – 0,237 e inferior a 0,118, respectivamente. A partir destes valores, as cepas utilizadas neste experimento foram classificadas nas diferentes categorias, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Cepas de *Staphylococcus* formadoras de biofilme.

Cepas Bacterianas	Média da Densidade Ótica do Ensaio de Biofilme (A_{570})	Categorias Analisadas*			
		1	2	3	4
1	0,815	X			
2	0,456		X		
3	0,734	X			
4	0,740	X			
5	0,165			X	
6	0,710	X			
7	0,928	X			
8	0,825	X			
9	0,465		X		
10	0,474	X			
11	0,556	X			
12	0,552	X			
13	0,517	X			

***Categorias** 1: Cepas fortemente formadoras de biofilme; 2: moderadamente formadoras, 3: fracamente formadoras e 4: não formadoras.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que todas as cepas de *Staphylococcus* analisadas neste experimento foram capazes de formar biofilme, sendo a maioria fortemente formadora.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington: APHA, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União. Brasília, 18 de setembro de 2003.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-193, 2002.
- 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, n. 3, p. 308-314, 2008.
- GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, p.1049-1056, 2008.
- GUIMARÃES, G.; FRANCA, C.A.; KRUG, F.S.; PEIXOTO, R.M.; KREWER, C.C.; LAZZARI, A.M.; COSTA, M.M. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.12, p.1219-1224, 2012.
- MELO, P.C. **Estudo Epidemiológico, Genotípico e Fenotípico de Estirpes de Staphylococcus aureus Produtoras de Biofilmes Isoladas do Ambiente de Ordenha e de Casos de mastite**. 2011. 161f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo.
- OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.118, p.133-140, 2006.
- SALUSTIANO, V. C. **Isolamento, ribotipagem e controle de Bacillus cereus após a pasteurização do leite**. 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- STEENACKERS, H.P.L.; ERMOLATEV, D.S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; DE COSTER, D.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E.V.; DE VOS, D.E.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Structure–activity relationship of 2-hydroxy-2-aryl-2,3-dihydroimidazo [1,2-a]pyrimidinium salts and 2N-substituted 4(5)-aryl-2-amino-1H-imidazoles as inhibitors of biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic Medical Chemistry**, v.19, 3462-3473, 2011.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; ŠVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, 175-179, 2000.
- STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; ŠVABIC-VLAHOVIC, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, n.5, p.428-432, 2004.