

BIOFILME BACTERIANO EM EQUIPAMENTO DE SALA DE ORDENHA

PEDRO RASSIER DOS SANTOS¹; ROSANA BASSO KRAUS²; GISELDA MARIA PEREIRA³; HELENICE GONZALEZ DE LIMA⁴; NATASHA DEBONI CERESER⁵; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – rassier1907@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rosana_basso_kraus@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - gmpereira08@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - helenicegonzalez@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - natachacereser@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – pattsn@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira está entre as principais atividades dentro do setor agropecuário realizadas no Brasil, responsável por grande relevância social e econômica para o país (LUCCA & AREND, 2020). Entretanto, tem se observado alguns problemas no setor, como problemas de qualidade do leite encontrado no Rio Grande do Sul, que apresenta altas contagens de micro-organismos, muitas vezes relacionados a falta de higiene na obtenção do mesmo (REIS et al., 2017).

Além disso, a formação de biofilme por micro-organismos é outro problema que vem crescendo dentro da produção leiteira, devido a sua formação em alimentos, utensílios e superfícies (FLACH et al., 2005). Biofilmes são um conjunto de bactérias com uma matriz de polímeros orgânicos, que permitem a adesão a qualquer superfície e formam uma espécie de crosta composta por partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas que dificultam a ação de compostos físicos e químicos utilizados para a higienização (COSTERTON et al., 1999).

Quando os biofilmes se estabelecem em materiais na linha de produção de alimentos, há elevação na carga microbiana devido a multiplicação contínua dos microrganismos e, consequentemente, pode ocorrer contaminação dos alimentos com os patógenos, devidos a eventuais desprendimentos das porções aderidas. Dessa forma, podem acarretar em riscos à saúde do consumidor e prejuízo financeiro a quem está produzindo o alimento, devido a queda na qualidade e diminuição do tempo de prateleira do produto e seus derivados (COSTERTON et al., 1999; FLACH et al., 2005).

Dante do exposto, torna-se importante avaliar a formação de biofilme bacteriano em materiais de sala de ordenha, para que se conheça mais sobre os micro-organismos e eventuais prejuízos que estes podem trazer para a cadeia leiteira. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme de bactérias gram-positivas previamente isoladas de teteira inicial de salas de ordenha em propriedades leiteiras localizadas no sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Neste estudo, foram utilizados 17 cocos gram-positivos, previamente identificados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das espécies *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Streptococcus uberis* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1) e *Staphylococcus intermedius* (1), que haviam sido coletados de equipamento de sala de ordenha (teteiras) e estocados no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Faculdade de

Veterinária (LIPOA) - UFPel. Além disso, foram utilizadas três ATCCs: 25904[®] (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach), 12600[®] (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbac) e 51299[®] (*Enterococcus faecalis* (Andrewes e Horder) Schleifer e Kilpper-Balz).

O preparo dos inóculos foi realizado a partir da semeadura das bactérias em ágar Brain Heart Infusion (BHI) incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as colônias foram dissolvidas em água destilada esteril com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Para o ensaio de formação de biofilme, foram confeccionados corpos de prova de material utilizado na confecção de teteiras iniciais (mangueiras) de equipamentos de ordenha, a partir de fragmentos de policloreto de vinila (PVC) de 1cm de comprimento, atóxicos e estéreis, de forma a deixá-los suspensos em caldo BHI em placas de 24 poços, seguindo a metodologia de Peralta et al. (2015).

O material produzido, foi incubado juntamente com os micro-organismos a serem estudados individualmente a 37°C por 72h para induzir a formação de biofilme. O experimento foi realizado em triplicata. Cada placa teve um controle negativo, apenas o meio caldo BHI e a amostra. Como controle positivo, para avaliar a formação de biofilme, foi utilizado a ATCC 25904 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach[®]).

Os espécimes foram lavados a cada 24h com solução de NaCl 0,9% (soro fisiológico), com troca do meio de cultura, de forma a manter apenas as células sésseis e descartar as células que estavam livres no meio, ou seja, que não aderiram.

Ao final de 72h, corpos de prova (mangueiras) foram coletadas, lavadas em solução de NaCl 0,9% para dispensar células livres, transferidas para um eppendorf com solução de NaCl 0,9% 1mL e sonicadas por 30s a 30W (Cole-Parmer Ultrasonic Processor[®] 60648 USA) para liberação todo o biofilme na solução salina, sem lise celular. Em seguida, diluições seriadas das suspensões foram realizadas até a diluição do inóculo equivalente a 10^{-7} . Todas as amostras foram semeadas em ágar BHI com duas alíquotas de 10µL de cada eppendorf e posteriormente incubadas a 37°C por 24h para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de acordo com Peralta et al. (2015).

Foi utilizada a seguinte equação para cálculo do número de Unidades formadoras de Colônias em cada amostra: CFU = (nº CFU / volume de inóculo) x diluição. Neste estudo, a concentração de 10^{-4} foi utilizada como padrão para todas as amostras.

Os dados obtidos não foram paramétricos e, por esse motivo, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, indicado para amostras independentes, considerando $p < 0,05$ no software BioEstat[®] versão 5.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes a formação de biofilme das amostras estão representados na figura 1.

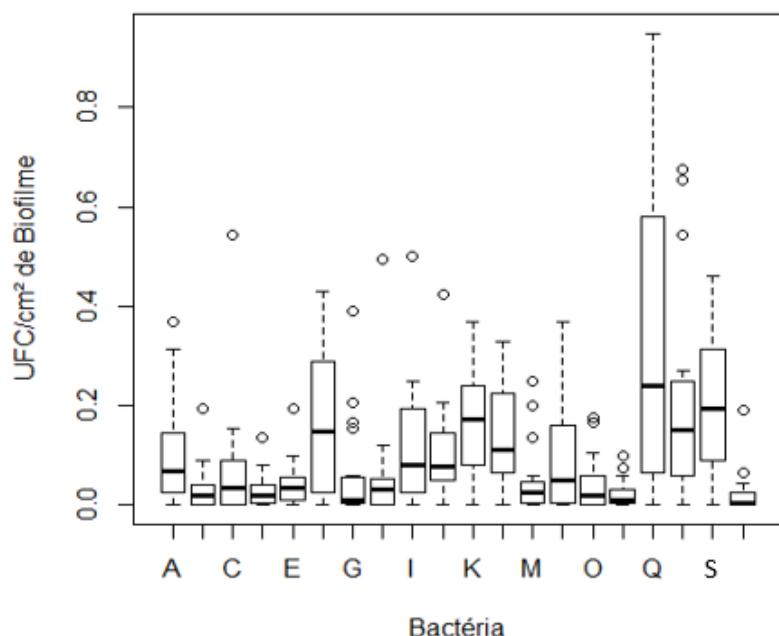


Fig 1. Formação de biofilme das amostras avaliadas, em UFC/cm², onde as letras representam os seguintes micro-organismos: (A) *Streptococcus dysgalactiae*; (B,C,D,F,G,H,M,N,O,P) *Enterococcus faecalis*; (E) *Streptococcus uberis*; (I,J,K,L) *Enterococcus faecium*; (Q) *Staphylococcus intermedius*; (R) ATCC 12600; (S) ATCC 25904 e (T) ATCC51299.

Onze amostras formaram biofilme estatisticamente igual ao controle utilizado (ATCC 25904), sendo todas as amostra de *E. faecium* (I,J,K,L), três *E. faecalis* (C,F,N), a ATCC 12600 (R) e os únicos isolados de *Streptococcus dysgalactiae* (A) e *Staphylococcus intermedius* (Q).

A menor formação de biofilme foi verificada na ATCC 51299 (T). Essa formação foi estatisticamente igual a *Streptococcus dysgalactiae* (A), nove amostras de *E. faecalis* (B,C,D,G,H,M,N,O,P), a única amostra de *Streptococcus uberis* (E) e duas amostras de *E. faecium* (I,J).

Pode-se observar que embora as amostras apresentem diferentes aptidões em formarem biofilme, observou-se pouca diferença entre elas, visto que algumas se mostraram estatisticamente igual a ATCC 25904 e ATCC 51299, que foram respectivamente, a maior e menor formadoras de biofilme observadas. Com relação a aptidão na formação de biofilme entre as duas espécies de *Enterococcus* avaliadas neste estudo, observou-se maior aptidão para *E. faecium*, do que *E. faecalis*, diferente do que MOHAMED; HUANG (2007) descrevem, onde segundo os autores, *E. faecalis* é a espécie que possui mais aptidão para formação de biofilme quando comparada com *E. faecium*.

A capacidade de formação de biofilme destes micro-organismos analisados pode acarretar em problemas dentro das propriedades de onde foram isolados, visto que podem estar relacionados ao aumento na taxa de corrosão de superfícies metálicas, redução da eficiência de transferência de calor e elevação da resistência de fricção do leite. Além disso, acarretam em queda na qualidade microbiológica dos produtos finais e perdas econômicas já que podem contaminar o leite, se proliferar e alterar suas propriedades nutricionais (CHERIF-ANTAR et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

As diferentes espécies bacterianas presente em superfícies de equipamentos de ordenha possuem capacidade de formação de biofilme em maior ou menor intensidade comparas a uma espécie ATCC com essa capacidade conhecida. A espécie que formou mais biofilme, depois do controle, foi a única amostra isolada de *Staphylococcus intermedius* e dentro do gênero *Enterococcus*, *E. faecium* apresentaram maior aptidão na formação do biofilme.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHERIF-ANTAR, Asma et al. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy science & technology**, v. 96, n. 1, p. 27-38, 2016.

DUTKA-MALEN, Sylvie; EVERIS, Stefan; COURVALIN, Patrice. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

FLACH, Juliana; KARNOOPP, Carolina; CORÇÃO, Gertrudes. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FORSMAN, Päivi; TILSAIA-TIMISJÄRVI, Anu; ALATOSSAVA, Tapani. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, v. 143, n. 11, p. 3491-3500, 1997.

LUCCA, Emerson Juliano; AREND, Silvio Cezar. A pecuária leiteira e o desenvolvimento da Região Noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Desenvolvimento Regional**, v. 7, n. 3, p. 107-142, 2020.

MASON, William J. et al. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3332-3338, 2001.

MOHAMED, Jamal A.; HUANG, David B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.

REIS, Eduardo Mitke Brandão et al. Identificação de pontos fracos e fortes associados à qualidade do leite em propriedade leiteiras de agricultura familiar. **PUBVET**, v. 11, p. 840-946, 2017.

COWAN, Samuel Tertius et al. Manual for the identification of medical bacteria. **Manual for the Identification of Medical Bacteria.**, 1965.

WAKITA, Yoshihisa et al. Development of a PCR test for the identification of *Staphylococcus intermedius* based on the 16S rDNA sequence. **Journal of veterinary medical science**, v. 64, n. 7, p. 603-605, 2002.