

## Área: Ciência de Alimentos

# QUANTIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR ISOLADOS DE *Pseudomonas* spp. ORIUNDOS DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO DE LEITE

Juliana Flach<sup>1\*</sup>, Valeska Grzybowski<sup>2</sup>, Geciane Toniazzo<sup>2</sup>, Gertrudes Corção<sup>3</sup>

*1 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS Campus Erechim, Erechim, RS. \*E-mail: Juliana.flach@erechim.ifrs.edu.br*

*2 Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Campus Erechim, Erechim, RS.*

*3 Departamento de Microbiologia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.*

**RESUMO** – Biofilmes representam uma perene fonte de contaminação do leite e formam-se em equipamentos ainda na propriedade rural. Buscou-se avaliar a produção de biofilmes *in vitro* por isolados de *Pseudomonas* oriundos de tanques de refrigeração de leite cru em propriedades rurais do município de Erechim/RS. Com suabe, foram coletadas amostras de tanques de refrigeração vazios e higienizados em sete propriedades, nos seguintes pontos de coleta: válvula de escoamento do leite (totalidade), lateral e homogeneizador (estes, com amostragem de 100 cm<sup>2</sup>). As células foram suspensas por agitação, diluídas em água peptonada (0,1%) e inoculadas em Ágar Base *Pseudomonas* e Ágar Cetrimide para isolamento de *Pseudomonas* spp., com incubação em 30°C/48h. A identificação de colônias típicas ocorreu através da amplificação e sequenciamento de um fragmento do rDNA 16S e por provas bioquímicas. A quantificação da formação de biofilmes foi realizada em placas de poliestireno com 96 cavidades, colorindo-se as células aderidas com violeta genciana (2%) e verificando-se a densidade óptica em 490 nm. Dos 66 isolados de *Pseudomonas* obtidos, 36 foram considerados não formadores de biofilme, 21 formadores fracos e nove formadores moderados. Houve predomínio de formadores de biofilme nos isolados do homogeneizador, talvez pela maior pressão seletiva associada à colonização desse local. Considerando que microrganismos do gênero *Pseudomonas* possuem diversas fontes de contaminação, é possível que alguns isolados tenham sido apenas depositados na superfície do equipamento, durante um processo de higienização mal conduzido ou pela própria contaminação ambiental, contribuindo para a elevação do número de isolados classificados como não aderentes.

**Palavras-chave:** Adesão. Propriedade rural. Leite cru.

## 1 INTRODUÇÃO

Biofilmes microbianos são aglomerados de células microbianas embebidas em matriz e depositados sobre uma superfície, representando a principal fonte de contaminação cruzada na indústria de alimentos. Sua formação ocorre nos mais diversos locais, como a interface líquido/ar, líquido/líquido ou sobre superfícies sólidas (MEYER, 2003).

O processo de formação de biofilmes envolve duas fases principais: reversível e irreversível. Na fase reversível, verifica-se uma interação fraca entre microrganismos e superfície, mediada por apêndices celulares como flagelos e fímbrias, presença de cápsula e forças intermoleculares. Já a fase irreversível caracteriza-se pela consolidação da adesão, multiplicação celular, formação de micro colônias e, posteriormente, de um biofilme maduro, cuja conformação tridimensional geralmente assemelha-se a cogumelos circundados por canais de água (HALL-STOODLEY et al., 2004).

A matriz que envolve as células possui composição química bastante diversa, geralmente com predomínio de carboidratos, proteínas, DNA extracelular (eDNA) e lipídios. Em virtude de seu caráter protetor, aumenta a resistência microbiana aos sanificantes de 10 a 1000 vezes, comprometendo o resultado da higienização (SIMÕES et al., 2010).

A presença de biofilmes em equipamentos geralmente está associada a falhas no processo de higienização dos mesmos, à presença de locais de difícil acesso para a higienização - decorrente de um design inadequado - e ao uso de materiais de difícil higienização ou com propriedades físico-químicas que favoreçam a atração das células à superfície (MEYER, 2003).

Na indústria de laticínios, entraves relacionados a biofilmes iniciam-se já em nível de propriedade rural, sendo detectados nos equipamentos de ordenha e nos tanques de refrigeração do leite. Neste equipamento em especial, devido às baixas temperaturas, é frequente a presença de biofilmes formados por microrganismos psicrotróficos como os do gênero *Pseudomonas*. Sendo o gênero *Pseudomonas* um conhecido produtor de enzimas extracelulares como lipases e proteases - inclusive termoestáveis - a presença de biofilmes formados por esses microrganismos durante o armazenamento do leite na propriedade rural pode comprometer toda a cadeia de beneficiamento dessa matéria-prima (DOGAN; BOOR, 2003). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biofilmes *in vitro* por isolados de *Pseudomonas* oriundos de tanques de refrigeração de leite cru em propriedades rurais do município de Erechim/RS.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta das amostras

Foram amostrados refrigeradores vazios e previamente higienizados pelos produtores de leite, oriundos de sete propriedades rurais diferentes, localizadas no interior do município de Erechim. Foram coletadas três

amostras por refrigerador, nos seguintes pontos: lateral, homogeneizador e válvula para drenagem do leite. Áreas de 10cm x 10cm provenientes da lateral e do homogeneizador do refrigerador foram amostradas com auxílio de suabe estéril umedecido em tampão fosfato (pH 7,2). A amostra do ponto de coleta na válvula do refrigerador foi obtida passando-se o suabe em toda a sua superfície interna. As amostras foram transportadas ao laboratório em caixa isotérmica com gelo e analisadas imediatamente.

## 2.2 Isolamento e identificação de *Pseudomonas* spp.

As células contidas nos suabes foram liberadas no tampão fosfato com auxílio de agitador de tubos (1 minuto). A suspensão foi diluída serialmente em água peptonada (0,1%) e inoculada em placas de Ágar Base *Pseudomonas* e Ágar Cetrimide para isolamento de *Pseudomonas* spp., com incubação em 30°C/48h.

Os isolados que apresentaram colônias típicas do gênero *Pseudomonas* foram agrupados conforme morfologia colonial, submetidos à coloração de Gram e estocados (-20°C) em caldo Triptona de Soja (TSB) com 25% de glicerol para análises posteriores. Representantes de cada uma das morfologias coloniais foram submetidos à confirmação de gênero através da amplificação e sequenciamento de um fragmento do rDNA 16S (SPILKER et al., 2004). Após, todos os isolados com morfologia colonial semelhante à dos isolados confirmados como *Pseudomonas* por biologia molecular foram submetidos a provas bioquímicas (O/F, redução de nitrato, catalase, oxidase, crescimento em 41°C, utilização de maltose, meso-inositol, sacarose, arginina, amido e gelatina; produção de pigmento fluorescente), para confirmação de gênero (MACFADDIN, 2000; BRENER, 2001).

## 2.3 Quantificação da formação de biofilmes

Os isolados de *Pseudomonas* foram submetidos ao teste para quantificação da formação de biofilmes, conforme Stepanovic et al. (2000; 2007), com modificações. Inicialmente, foram repicados em Ágar Triptona de Soja (TSA) durante dois dias consecutivos para ativação das células. Após, foi efetuada a suspensão das células em caldo TSB com ajuste de turbidez conforme escala 0,5 de McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, 200 µL da suspensão de células foram aliquotados em triplicata em microplaca de poliestireno com 96 cavidades, incubando-a tampada em 30°C/24h. Como controle negativo de adesão, foram aliquotados (triplicata) 200 µL de caldo TSB estéril em cada microplaca testada.

Após, o caldo TSB foi aspirado e as cavidades lavadas três vezes com 250 µL de solução salina estéril (0,85% de NaCl) para a remoção de células planctônicas. Então, as células aderidas foram fixas com 200 µL de metanol 99% (15 min) e a microplaca seca ao ar. Depois, as cavidades foram coradas com 200 µL de solução de cristal violeta (2%) de Hucker para coloração de Gram (5 min). Após, o corante foi escorrido e rinsado em água corrente, com posterior secagem da microplaca. Finalmente, o corante que permaneceu nas cavidades foi resolubilizado em 160 µL de ácido acético glacial (33%).

A leitura da densidade ótica (DO) de cada cavidade foi efetuada em leitor de microplacas (EL800 Biotek Instruments, INC.) em comprimento de onda de 490 nm. Foram calculados a média e o desvio padrão da DO do controle negativo, sendo o ponto de corte (DOc) estabelecido como três desvios-padrão acima da média

do controle negativo. Foram considerados não formadores de biofilme os isolados com  $DO \leq DOc$ ; formadores fracos os com  $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ; formadores moderados os com  $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$  e formadores fortes os com  $4 \times DOc < DO$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 66 isolados de *Pseudomonas*. Destes, 36 foram classificados como não formadores de biofilme, 21 como formadores fracos e nove como formadores moderados (Tabela 1). Verifica-se que nos pontos de coleta da lateral e da válvula do tanque de refrigeração houve predomínio de isolados não formadores de biofilmes. Entretanto, tal resultado não se repetiu para o homogeneizador, no qual houve predomínio de isolados formadores de biofilmes. Uma possível razão para explicar esse resultado poderia ser a diferença na pressão seletiva para a colonização dos pontos de coleta: o homogeneizador, por estar em constante movimento durante o uso do equipamento, dificulta a colonização por microrganismos não aderentes. Considerando-se o acesso do manipulador aos pontos de coleta no momento da higienização, sem dúvida, o homogeneizador é o local mais facilmente acessível. Assim, além da pressão seletiva associada ao movimento, também ocorre a seleção associada à ação mecânica exercida pelo manipulador no momento da higienização, favorecendo a permanência de microrganismos aderentes.

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Pseudomonas* e quantificação da formação de biofilmes *in vitro*.

Pontos de coleta	Isolados de <i>Pseudomonas</i>	Quantificação da formação de biofilmes			
		NAO	FRA	MOD	FOR
Lateral	12	7	4	1	0
Homogeneizador	17	5	8	4	0
Válvula para escoamento de leite	37	24	9	4	0
Total	66	36	21	9	0

NAO: não formador; FRA: formador fraco; MOD: formador moderado; FOR: formador forte.

A grande diversidade de fontes de contaminação do tanque de refrigeração por *Pseudomonas* merece discussão: devido a sua distribuição ubiqüitária, água, ar, manipulador de alimentos, pele/pêlo de gado leiteiro, ração animal e diversos outros podem ser considerados fontes de contaminação por esse gênero (DOGAN & BOOR, 2003). Assim, a presença de *Pseudomonas* no equipamento, pode facilmente ser associada a pequenas falhas em sua higienização. Não foi objetivo deste trabalho identificar a origem dos isolados de *Pseudomonas*, mas, é possível que diversos deles tenham sido apenas depositados na superfície do equipamento durante a higienização, o que pode ter contribuído para a elevação do número de isolados classificados como não formadores de biofilmes.

Em biofilmes multiespécie - que ocorrem nos tanques de refrigeração e na indústria de alimentos de um modo geral - o papel desempenhado por cada espécie microbiana é bastante peculiar, tanto no processo de formação do biofilme, quanto na atividade metabólica de um biofilme já formado. A atuação das espécies conhecidas por serem colonizadoras iniciais da superfície, como as do gênero *Pseudomonas*, é crucial para o desenvolvimento de um biofilme. Após a consolidação da adesão, verifica-se significativas alterações nas propriedades físico-químicas da superfície sobre a qual esta ocorreu, acarretando no favorecimento da incorporação de espécies com reduzida capacidade de adesão e, portanto, más colonizadoras iniciais (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

## 4 CONCLUSÃO

Tanques de refrigeração de leite são colonizados por microrganismos capazes de aderir em sua superfície e de formar biofilmes. A má condução da higienização desses equipamentos pode representar fonte de contaminação até mesmo por patógenos ou deterioradores com reduzida capacidade de adesão, comprometendo a qualidade do leite cru.

## 5 REFERÊNCIAS

- BRENER, J. D. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**:Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. 2nd ed. Boston: Springer, 2005.
- DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 130–138, 2003.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews – Microbiology**, v.2, p. 95-108, 2004.
- MACFADDIN JF. **Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria**. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000.
- MEYER B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 249–253, 2003.
- SIMÕES M.; SIMÕES L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science Technology**, v. 43, p. 573–583, 2010.
- SPIPKER T, COENYE T, VANDAMME P, LIPUMA JJ. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.2074–2079, 2004.
- 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.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891–899, 2007.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p. 125-148, 1994.