



## FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJO FRESCAL COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE ALEGRE – ES

Joyce Aparecida Corrêa da Costa<sup>1</sup>, Bruna Maria Fia Pimentel<sup>2</sup>, Kássia Vidal Menezes<sup>3</sup>, Myleny Goularte Moreira<sup>2</sup>, Mariana Drummond Costa Ignacchiti<sup>2</sup>, Juliana Alves Resende<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alegre - ES, Brasil  
coosta.joyce@gmail.com.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Alegre - ES, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alegre – ES, Brasil

**Resumo:** O objetivo foi avaliar a habilidade de formação de biofilme por *Escherichia coli* isoladas de amostras de queijo fresco. Das 51 linhagens, 15,69% apresentaram biofilme com pouca aderência, 78,43% aderência moderada e 5,88% foram muito aderentes. Ressalta-se que a formação de biofilmes é um importante fator na contaminação em indústrias de alimentos, levando a preocupação com a preservação da integridade dos alimentos e disseminação destas linhagens nos alimentos que serão consumidos *in natura*.

**Palavras-chave:** Biofilme; *Escherichia coli*; linhagens.

### INTRODUÇÃO

O aumento na linha de produção de queijos vem ganhando destaque, segundo Caetano (2018) no ano de 2017, a produção de queijo atingiu a marca de um milhão de toneladas no Brasil. O queijo fresco é um produto fabricado a partir do leite de vaca, sendo de massa crua e possuindo elevado teor de umidade, em torno de 55 – 62%. Por ser visto como um processo de fabricação simples, sua produção é feita por laticínios de grande e pequeno porte, o que torna seu consumo popular em todo território brasileiro (Furtado, 1991).

O queijo fresco, devido ao alto teor de umidade, valor de pH pouco ácido e grande manipulação durante a fabricação, é extremamente suscetível aos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que afetam as características de qualidade, rendimento e durabilidade (Apolinário et al., 2014; Araújo et al., 2002). Para obtenção do queijo fresco em boas condições é necessário cuidado desde a obtenção da matéria-prima até a comercialização do produto. A introdução de leite com alta carga microbiana pode acarretar em comprometimento em toda linha de produção dos queijos, gerando prejuízos e malefícios à saúde do consumidor, sendo considerado um dos fatores mais críticos da contaminação (Sharaf et al., 2014).

Nas últimas décadas houve um aumento na preocupação com os fatores de riscos relacionados às doenças alimentares. Segundo o Ministério da Saúde, entre os anos 2000 e 2018 foram registrados cerca de 7,8% de casos de surtos alimentares, cuja as fontes de

contaminação foram em virtude de ingestão de leite e seus derivados (Brasil, 2019). Pesquisas vêm demonstrando cenários desfavoráveis na fabricação do queijo fresco em ocorrência de contaminações por microrganismos patogênicos afetando sua qualidade (Vieira, 2008).

As bactérias do grupo coliforme são consideradas umas das principais causadoras de contaminação e deterioração do queijo, nelas incluem bacilos Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos não formadores de esporos, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. Essas bactérias têm grande potencial de contaminação, pois são capazes de ocasionar a fermentação da lactose (Franco e Landgraf, 2003). Dentre essas bactérias se destaca a *Escherichia coli*. Por ser um microrganismo que reside no trato intestinal humano e de animais de sangue quente e apresentar fáceis características de isolamento e identificação, é considerada um bom indicador de contaminação fecal de água e alimentos (Silva et al., 2017).

A *E. coli* adquiriu destacada relevância entre os microrganismos devido a sua capacidade de formação biofilme. A formação de biofilmes microbianos se dá através de uma série de etapas sequenciais, onde comunidades de células estão intimamente ligados entre si, apresentando um maior nível de organização do que células isoladas, e que interagem com superfícies bióticas ou abióticas, ou seja, contendo vida ou não (Menezes et al., 2021).

O biofilme é formado através de um processo gradual e dinâmico que se configura por várias etapas, nas



quais podemos destacar: (i) fixação inicial, processo dependente de propriedades físico-químicas da superfície bacteriana e a superfície onde ocorrerá a adesão ainda reversível; (ii) ligação irreversível da bactéria com a superfície; (iii) desenvolvimento da arquitetura do biofilme, na qual resultará acúmulo e multiplicação de microrganismo e produção de EPS; (iv) maturação, desenvolvimento do biofilme em uma estrutura organizada que pode levar 10 ou mais dias; (v) dispersão, na qual permite que as células voltem ao estado planctônico (Menezes et al., 2021; Oliveira, 2017).

Essa comunidade microbiana tem grande capacidade de multiplicação e são protegidas por uma matriz viscosa, formada por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), produzidas pelas próprias células do biofilme (Whitchurch et al., 2002). Células bacterianas presentes no biofilme têm características de serem resistentes a ambientes hostis e estressantes, como, ambientes em que são utilizados agentes sanitizantes, dessecação e luz ultravioleta. Isso se justifica devido as variedades dos fenótipos e do metabolismo das bactérias do biofilme, o que ocasiona a dificuldade de difusão dos sanitizantes e antimicrobianos (Herrera et al., 2007; Parsek e Fuqua, 2004).

Bactérias presentes nos biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos, chegando a ser de 10 a 100 vezes mais tolerantes, podendo gerar doenças crônicas de difícil tratamento, devido à resistência aos antimicrobianos e prejudicar a resposta da terapia medicamentosa, elevando a progressão da doença e custos do tratamento (Davies, 2003; Stewart, 2002). Acredita-se que o biofilme seja responsável por cerca de 65 – 80% das doenças infecciosas que afetam humanos e animais, portanto, o impacto dessas comunidades microbianas na medicina veterinária e humana, não pode ser ignorado (Abdullahi et al., 2016; Trentin et al., 2013).

Diante o exposto, a cadeia produtiva do queijo frescal é importante dado à diversidade de reservatórios de bactérias potencialmente patogênicas. Neste contexto, a *E. coli* é uma enterobactéria frequentemente isolada, que adquiriu destacada relevância entre os microrganismos mais comumente envolvidos em doenças de difícil tratamento, devido a padrões de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência, como a formação de biofilme. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a habilidade de formação de biofilme por *E. coli* isoladas de amostras de queijo frescal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas um total de 9 peças inteiras de queijos frescal de 3 diferentes marcas comerciais, obtidas em supermercados do município de Alegre –

ES. As amostras foram adquiridas em sua embalagem original, não sendo adquiridas amostras já fracionadas no local de venda. Todas as amostras estavam dentro do seu prazo de validade estipulado pela indústria produtora e exposta à venda para o consumidor em balcões ou ilhas de exposição dentro dos supermercados. Todas possuíam o Selo de Inspeção Federal (SIF). Destas amostras foram isoladas 72 linhagens de coliformes totais, nas quais 51 confirmaram ser *E. coli*. A partir dessas 51 linhagens foi iniciado a avaliação da capacidade de biofilme.

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Dias et al. (2017) com modificações. Inicialmente, a partir de um de cultivo de 24 h da *E. coli* em ágar nutriente foi realizado inóculo padronizado de acordo com escala 0,5 Mac Farland ( $10^8$  UFC/mL) em caldo triptona soja (TSB - *trypticase soy broth*). O inóculo foi ajustado para  $1 \times 10^6$  UFC/mL e aplicados em poços de placas de poliestireno de 96 poços acrescido de mais 100  $\mu$ L de caldo nutriente ( $1 \times 10^4$  UFC/poço). As placas foram tampadas e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 35°C. O controle negativo foi realizado com caldo nutriente e um controle padrão do biofilme com linhagem de *E. coli* (ATCC 25922) + 100  $\mu$ L meio de cultura.

Após o período de crescimento, os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. A placa foi deixada destampada em uma capela por 45 minutos para secagem. Em seguida, uma solução de cristal violeta (0,1%) foi adicionado em cada poço e a placa foi novamente incubada em temperatura ambiente. Após esse período, lavou-se a placa com solução salina para retirar o excesso do corante não incorporado nas células bacterianas. O corante incorporado foi extraído pela adição de etanol 95%. O sistema foi fechado e deixado em repouso por 15 minutos. Após este período, foi feita a leitura em leitor de microplacas (Thermo Scientific/Brasil) com filtro de 596nm. A absorbância foi equivalente à densidade de bactérias aderentes, e os resultados foram registrados como uma média de três réplicas.

O biofilme foi classificado de acordo com a comparação entre a leitura de absorbância do biofilme e a leitura de absorbância do controle negativo, como previamente proposto por Stepanovic et al., 2000). Quando a absorbância do biofilme for inferior à absorbância do controle negativo, o biofilme é considerado não aderente ( $\text{Abs biofilme} \leq \text{Abs controle negativo}$ ); quando a absorbância do biofilme for maior em até duas vezes a absorbância do controle negativo, o biofilme é considerado pouco aderente ( $\text{Abs biofilme} \leq 2 \times \text{Abs controle negativo}$ ); quando a absorbância do biofilme formado for entre 2 a 4 vezes da absorbância do controle negativo, o



biofilme é considerado de aderência moderada ( $2 \times \text{Abs controle negativo} < \text{Abs biofilme} \leq 4 \times \text{Abs controle negativo}$ ) e quando a absorbância do biofilme for superior a 4 vezes absorbância do controle negativo, o biofilme é considerado muito aderente ( $\text{Abs biofilme} > 4 \times \text{Abs controle negativo}$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alimentos são facilmente contaminados se os microrganismos tiverem condições favoráveis de crescimento, podendo alterar as características físicas e químicas do produto ocasionando a sua deterioração. Assim, a análise microbiológica de um alimento tem um efeito decisivo na qualidade e segurança do produto. O queijo fresco contaminado por elevados níveis de bactérias torna-se inadequado para o consumo, uma vez que não atende às expectativas do consumidor em termos de valor nutricional, segurança (qualidade higiênico-sanitária) e satisfação (atributos sensoriais) (Kamimura et al., 2019). Neste estudo, linhagens de *E. coli* foram isoladas de queijo fresco comercializados no município de Alegre – ES e a capacidade de formação do biofilme destes isolados foi avaliada.

Para todas as linhagens avaliadas foi possível observar a presença de células bacterianas coradas e aderidas na placa (Figura 1). O valor médio da absorbância do controle negativo foi de 0,108 e da linhagem controle foi 0,467. Os valores médios e o desvio padrão das linhagens avaliadas estão apresentadas na Tabela 1.

Outros estudos, utilizando a mesma metodologia, encontraram diferentes valores de densidade óptica para formação de biofilme. Dias et al., (2017), mostrou a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* no qual os valores encontrados variavam de 0,88 e 1,60. Pereira et al. (2016) analisando linhagens de *Klebsiella pneumoniae* encontrou resultados variando entre 0,310 – 0,469.

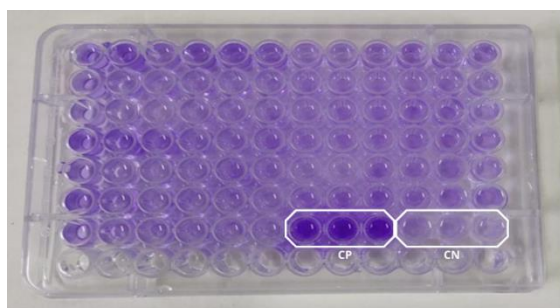


Figura 1. Fotografia da placa de 96 poços após coloração com cristal violeta (0,1%). (CP) controle positivo. (CN) controle negativo.

Tabela 1. Perfil de habilidade de formação de biofilme de *Escherichia coli* em amostras de queijo fresco comercializados no município de Alegre – ES.

Característica fisiológica	<i>Escherichia coli</i>	
	Média	Desvio padrão
Formação de biofilme (OD596nm)	0,284	0,016

Coelho et al. (2011), avaliou a formação de biofilme em 50 linhagens de *Staphylococcus aureus*, provenientes de leite ordenhados de 15 propriedades do Rio de Janeiro, sendo que 80% das amostras avaliadas tiveram produção *in vitro* de biofilmes.

O poder que os microrganismos têm de se fixar na superfície dos alimentos é visto como um dos passos iniciais para a sua deterioração, visto que sua permanência e proliferação vão depender de continuarem aderidos. Entender as características da formação de biofilme em alimentos frescos pode ajudar a estabelecer diretrizes para um armazenamento adequado (BAE et al., 2012). Os microrganismos podem ser indicados como formadores ou não de biofilme, podendo ter aderência forte, moderada ou fraca. Com relação a classificação fenotípica do biofilme formado pelas linhagens avaliadas os dados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização fenotípica de formação de biofilme de *Escherichia coli* em amostras de queijo fresco comercializados no município de Alegre – ES.

Classificação	<i>Escherichia coli</i> (%)
Não aderente	0% (n = 0)
Pouco aderente	15,69% (n = 8)
Aderência moderada	78,43% (n = 40)
Muito aderente	5,88% (n = 3)
Total	100% (n = 51)

Microrganismos produtores de biofilme são de grande risco a segurança microbiológica das indústrias de laticínios. Em estudo realizado por Cherif-Antar et al. (2016), diversas bactérias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas de tubulações de aço inoxidável onde ocorre o processamento do leite. Dentre essas bactérias a *K.*



*pneumoniae*, *A. calcoaceticus* e *P. aeruginosa* destacaram-se pela capacidade moderada a elevada de produção de biofilme. A produção de biofilme em superfície e aparelhos de manejo na manipulação de derivados do leite indica falhas no processo de higienização e limpeza, o que propicia a contaminação do produto por patógenos que estavam anteriormente aderidos.

Bravo e Sturion (2016) relataram considerável formação de biofilme por *Staphylococcus* sp. em superfície de materiais utilizados na indústria de laticínios, como o aço inoxidável e o polipropileno, à temperatura de 25°C. Segundo Reis-Teixeira et al. (2017), foi observada a produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* nos aparelhos e equipamentos usados nas indústrias de alimentos (superfícies de aço inox, vidro, mármore e granito). Marquezine (2015), analisou a formação de biofilme por *Salmonella* isolada de empresas de aves e abate, e verificou que todas as linhagens foram formadoras de biofilme *in vitro*.

As bactérias patogênicas que geralmente crescem em biofilmes multicelulares possuem uma alta resistência a estratégias antimicrobianas. Assim, a fim de entender como os biofilmes se formam e contribuem para a infecção, sistemas de biofilme *in vitro*, têm sido amplamente utilizados por grupos de pesquisa em todo o mundo (Manner et al., 2017).

Embora esses métodos tenham aumentado a compreensão da habilidade de formação dos biofilmes, no ambiente *in vivo* há uma interação complexa entre o ambiente e o patógeno, que não é facilmente replicada em ensaios *in vitro*. A compreensão mais aprofundada desta dinâmica certamente propiciará novas estratégias para lidar com estas adaptações microbianas e evitar disseminação destes microrganismos.

### CONCLUSÃO

Todos os isolados de *E. coli* avaliados possuíam a habilidade de formação de biofilme. Das linhagens isoladas 15,69% apresentaram com pouca aderência, 78,43% possuindo aderência moderada e 5,88% foram muito aderentes.

### AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

### REFERÊNCIAS

- Abdullahi, U. F. et al. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Veterinary World*, v. 9, n. 1, p. 12, 2016.
- Apolinário, J. E. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. *Revista Do Instituto De Laticínios Cândido Tostes*, v. 69, n. 6, p. 433 – 442, 2014.
- Araújo, et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92 n. 6, p.1172 – 1177, 2002.
- Bae, Y. M. et al. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, v.153, p. 465 – 473, 2012.
- Brasil. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: Informe 2018. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, 2019.
- Bravo, M. L. M. C.; Sturion, G. L. Estudo genotípico e fenotípico de *Staphylococcus* spp formadores de biofilme isolados em linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite no Estado de São Paulo, Brasil. 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologias de Alimentos - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- Caetano, M. Produção de queijo deve crescer 2,5% neste ano com aumento do consumo. 2018. Disponível em: <https://www.dci.com.br/industria/producao-de-queijo-deve-crescer-2-5-neste-ano-com-aumento-do-consumo-1.698571>. Acesso em: 30/04/2020.
- Cherif-Antar. A. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science Technology*. v. 96, p. 27–38, 2016.
- Coelho, S. M. O. et al. Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 94, p. 3305 – 3310, 2011.





- Davies, D. G. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 114 – 122, 2003.
- Dias, V. C. et al. Epidemiological, physiological, and molecular characteristics of a Brazilian collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, v. 23, n. 7, p. 852-863, 2017.
- Furtado, M. M. A Arte e a Ciência do Queijo. 2. ed. São Paulo: Editora Globo, p. 297, 1991.
- Franco, B. D. G. M; Landgraf, M. Microbiologia dos Alimentos, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- Herrera, J. J. R. et al. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three diferente experimental conditions. *Food Microbiology*, v. 24, p. 585 – 591, 2007.
- Kamimura, B. A. et al. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 18, n. 5, p. 1636 – 1657, 2019.
- Manner, S. et al. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-Microtiter Well Plates and Drip Flow Reactors: Critical factors influencing outcomes. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- Marquezine, M. G. Avaliação da capacidade de produção de biofilmes e detecção da enzima KPC em *Salmonella spp.* isolada de aviário e linha de abate de aves. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- Menezes, K. V. et al., Produtos naturais com atividade anti-biofilme para tratamento de doenças infecciosas de importância veterinária. Tópicos especiais em ciência animal X. p. 254-273. Alegre:CAUFES, 2021.
- Oliveira, G. S. Biofilme Multiespécie Formado pela Microbiota Contaminante do Leite Cru. Viçosa – MG, 2017.
- Parsek, M. R.; Fuqua, C. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 14, p. 4427 – 4440, 2004.
- Pereira, J. et al. Removal Torque and Biofilm Accumulation at Two Dental Implant-Abutment Joints After Fatigue. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 31, n. 4, 2016.
- Reis-Teixeira, F. B. et al. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 587 – 591, 2017.
- Silva, N. et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 5 ed.. São Paulo: Livraria Varela. 2017.
- Sharaf, O. M. et al. Prevalence of some pathogenic microorganisms in factories Domiati, Feta cheeses and UHT milk in relation to public health sold under market conditions in Cairo. *International Journal of ChemTech Research*, v. 6, n. 5, p. 2807–2814, 2014.
- Stepanovic, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- Stewart, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International*, 2002.
- Trentin, et al. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- Vieira, K. P. et al. Contaminação de queijo Minas frescal por bactérias patogênicas: Um risco á saúde. *ConScientia e Saúde*, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 201-206, 2008.
- Whitchurch, C. B. et al. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*, v. 295, 2002.