Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes

Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers

Anelise Bravo Friedriczewski¹, Eliezer Ávila Gandra², Rita de Cássia dos Santos da Conceição¹,
Natacha Deboni Cereser¹, Lauren Machado Moreira¹ & Cláudio Dias Timm¹

ABSTRACT

Background: The buffalo milk mozzarella cheese is a new product in the market, with high consumer acceptance and excellent prospects for trade. The cheese is rich in nutrients, which favors the proliferation of microorganisms that can cause food-borne diseases in the consumer. *Staphylococcus aureus* can cause gastro-enteritis in humans by the production of enterotoxins in food. One problem that may hinder the elimination of undesirable microorganisms in the food industry is the formation of biofilms. The objective of this study was to determine the effect of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo mozzarella cheese on sensitivity to sanitizers.

Materials, Methods & Results: Fifty samples of buffalo mozzarella cheese were analyzed to investigate the presence of *S. aureus*. The isolates were obtained through microbiological analysis and identified by PCR. The similarity of the strains was compared through rep-PCR. The distinct strains were tested for biofilm formation in microtiter plates. Soy Trypticase Broth (TSB) was placed in each well of the microtiter plate and overnight cultures of each strain was added. Wells without bacterial culture were used as controls. A villous cap was then placed on the plate and incubated for 48 h at 37°C. During incubation, the biofilms formed on the surface of the villi of the caps. For quantification of biofilm formation, material that remained attached to the cap was stained with crystal violet, the stained biofilm was extracted and the OD570 of each well was measured. Each strain was classified as non-biofilm forming, weak forming, moderately formed or formative strong. Strong forming and non-biofilm forming strains were tested on high density polyethylene, stainless steel and glass surfaces. Plates of 4 cm² of the different materials were placed in TSB where the culture of each isolate was inoculated separately. At each 48 h incubation the plates were washed to remove unbound cells and re-inserted into TSB without the inoculum. After five replicates of the procedure, sterile swabs were passed over the entire surface of each plate for counting in Baird-Parker agar. They were also tested for sensitivity to sodium hypochlorite and iodine after biofilm formation. The biofilm plates were immersed in flasks containing sanitizers, where they remained for 10 min. At the established contact time, the plates were immersed in neutralizing solution for 30 s. After washing with PBS, a sterile swab was passed on the surface of each plate and counts on Baird-Parker agar were performed. The bands profiles obtained on rep-PCR were identical when compared to isolates from the same sample, indicating that each sample was contaminated with only one *S. aureus* strain. From the twenty *S. aureus* strain identified, two isolates were classified as strong biofilm formers, seven as moderate formers, ten weak formers and one as non-biofilm builder. The two strong forming strains produced biofilm on the three surfaces tested. The application of sodium hypochlorite and iodine sanitizers promoted a reduction of approximately 2 log bacterial populations on all surfaces of both the biofilm and non-forming strains.

Discussion: Most strains of *S. aureus* isolated from buffalo milk mozzarella cheese have the ability to form biofilm on the surfaces of equipment and utensils that have stainless steel, glass or high density polyethylene components. Although biofilm forming strains are no longer resistant to sanitizers sodium hypochlorite and iodine than non-forming sanitizers, they reach higher concentrations in the biofilm, resulting in larger bacterial populations remaining after application of the sanitizers. These results support the recommendation that the good hygienic practices adopted by industries processing buffalo milk mozzarella cheese should include specific measures to control the *Staphylococcus aureus* contamination.

Keywords: food safety, dairy product, public health, contamination.

Descritores: segurança dos alimentos, laticínio, saúde pública, contaminação.

DOI: 10.22456/1679-9216.81813

Received: 24 September 2017

Accepted: 22 January 2018

Published: 9 February 2018

¹Inspecção de Produtos de Origem Animal & ²Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: C.D. Timm [timm@ufpel.tche.br - Tel.: +55 (53) 32757216]. Inspecção de Produtos de Origem Animal, UFPel, Campus Capão do Leão, prédio 34. CEP 96160-000 Capão do Leão, RS, Brazil.

Verificação da formação de biofilme em diferentes superfícies

Os isolados considerados formadores de biofilme nas placas de microtitulação foram testados quanto à capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies, utilizando técnica já estabelecida [16], com pequenas modificações. Foram utilizadas placas de superfícies planas com 4 cm² de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro estéreis. Todas as diferentes superfícies foram colocadas dentro de um Becker contendo 200 mL de TSB e 4 mL de cultura overnight de cada isolado separadamente. A cada 48 h de incubação, as placas foram lavadas suavemente duas vezes com PBS 3% NaCl para remoção de células não aderidas e novamente inseridas em Becker com 200 mL de TSB, porém sem o inóculo. Após cinco repetições do procedimento, foram passadas zaragatoas estéreis sobre toda a superfície de cada placa e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina 0,85%. A partir desta, foram feitas diluições seriadas para contagem dos microrganismos em ágar Baird-Parker¹. Uma cepa não formadora de biofilme foi utilizada como controle negativo. As contagens que alcançaram 107 UFC/cm² foram consideradas como oriundas de superfícies onde houve formação de biofilme [2].

Sensibilidade dos isolados em biofilme a sanitizantes

A eficácia dos sanitizantes hipoclorito de sódio (solução contendo 100 ppm de Cl₂) e iodo (solução com 50 ppm de I₂) frente aos isolados de *S. aureus* que formaram biofilmes sobre as placas de microtitulação foi avaliada. Utilizando o método previamente descrito [16], após a última lavagem, as placas com biofilme foram imersas em frascos contendo sanitizantes, onde permaneceram durante 10 min. Alcançado o tempo de contato estabelecido, as placas foram imersas em solução neutralizante (0,1 M Na₂S₂O₃) por 30 s. Após lavagem com PBS, foi passada uma zaragatoa estéril na superfície de cada placa e realizada contagem em ágar Baird-Parker.

Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Foi realizada análise de variância das contagens de *Staphylococcus aureus* e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey [25].

RESULTADOS

Das 50 amostras de queijo mussarela elaborados com leite de búfala analisadas no trabalho, 20 (40%) estavam contaminadas por *Staphylococcus aureus*, das quais foram obtidos 22 isolados. Os perfis de bandas obtidos na rep-PCR foram idênticos quando comparados entre os isolados oriundos da mesma amostra, indicando que cada amostra estava contaminada por apenas uma cepa de *S. aureus*.

No teste de formação de biofilme em placas de microtitulação realizado com os 20 isolados de *S. aureus*, dois foram classificados como forte formadores de biofilme, sete como moderados formadores, dez como fracos formadores e um não formou biofilme.

As duas cepas fortemente formadoras de biofilme (131 e 97) e a única cepa que não formou biofilme (101) foram testadas quanto a capacidade de formar biofilme nas superfícies de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro. As cepas 131 e 97 formaram biofilme nas três superfícies, indistintamente, ao passo que a cepa 101 apresentou populações que não alcançaram o limite necessário para admitir a formação de biofilme em nenhuma delas (Tabela 1).

A ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo foi avaliada frente às cepas de *S. aureus* fortemente formadoras de biofilme (97 e 131) e a não formadora (101). A análise de variância mostrou efeito das cepas e dos sanitizantes sobre as contagens, mas não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os dois sanitizantes. Embora a cepa 101 tenha apresentado significativo decréscimo ($P > 0,05$) após a exposição aos sanitizantes, o que seria esperado, também foi observada diminuição nas contagens das cepas 97 e 131 (Figura 1).

Tabela 1. Isolados formadores de biofilme (131 e 97) e não formadora (101) em diferentes superfícies.

Superfície	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> (Log UFC/mL)*		
	Cepa 101	Cepa 131	Cepa 97
Polietileno	11,61 ^a	18,00 ^b	18,84 ^b
Aço Inoxidável	12,00 ^a	18,60 ^b	16,28 ^b
Vidro	11,76 ^a	18,74 ^b	19,06 ^b

*Médias de três repetições; ^{a,b}Médias seguidas por letras distintas diferem do teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 1. Contagens de *S. aureus* formadores de biofilme (cepas 131 e 97) e não formador (cepa 101) em superfície de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro após a ação de sanitizantes. ^{A,B,C}Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey quanto à cepa ($P < 0,05$); ^{ab}Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey quanto ao sanitizante ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

A capacidade de formar biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina e de amostras de leite de vaca já foi demonstrada em outros estudos. Em um estudo sobre a formação de biofilme por *S. aureus* isolados de mastite bovina [15], foi verificado que, de 94 isolados estudados, 93 (98,9%) foram capazes de formar biofilme. Em outro trabalho [7], o potencial de formação de biofilme de 50 *S. aureus* isolados de leite de vaca foi avaliado e foi observada formação de biofilme em 80% dos isolados. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos sobre formação de biofilme dirigidos a *S. aureus* isolados de leite de búfala, sendo este o primeiro trabalho que analisa esta propriedade de isolados dessa espécie obtidos de algum derivado lácteo. Embora com diferentes intensidades, 19 isolados foram capazes de formar biofilme, o que

demonstra não haver muita distinção, quanto a esta característica, entre os isolados de leite de bovinos e de derivados lácteos produzidos com leite de bubalinos, os quais, em ambos os casos, na sua maioria, são capazes de formar biofilme.

A formação de biofilme depende de alguns fatores, entre eles destacam-se as propriedades físico-químicas das superfícies. As hidrofóbicas, como o polietileno, são facilmente colonizadas por microrganismos. Por outro lado, as hidrofílicas, como as superfícies de vidro e metal, tendem a ser menos susceptíveis a adesão de microrganismos [21]. Entretanto, estas características não influenciaram a formação de biofilme no nosso estudo, já que os isolados 131 e 97, considerados forte formadores de biofilme no teste em placas de microtitulação, desenvolveram biofilme tanto sobre polietileno, como sobre vidro e aço, indis-

tintamente. Resultados semelhantes têm sido obtidos por outros autores [14,24] utilizando superfícies de aço inoxidável, vidro e polipropileno. Entretanto estes estudos foram desenvolvidos utilizando uma única cepa de referência da bactéria, o que limita a extrapolação dos seus resultados. Em um dos poucos estudos com isolados selvagens de *S. aureus* [3] foi constatada a capacidade de *S. aureus* isolados de leite de vaca formarem biofilme em aço inoxidável.

Na indústria de alimentos, são utilizados diversos tipos de sanitizantes com o objetivo de tornar a superfície que entrará em contato com o alimento higienizada, evitando assim problemas com contaminações microbianas. Deste modo, a sanitização deve reduzir ou eliminar completamente a presença de microrganismos nas diferentes superfícies [18].

A aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo promoveu uma redução das populações bacterianas de aproximadamente 2 log em todas as superfícies, tanto dos isolados formadores de biofilme como do não formador, com exceção do isolado 97 em aço inoxidável, onde a redução foi um pouco menor. Estes resultados mostram que a maior população bacteriana que permaneceu após a ação dos sanitizantes sobre os isolados formadores de biofilme em relação ao não formador se deveu à maior população inicial encontrada nos biofilmes e não a diferenças de resistência bacteriana ou de acesso do sanitizantes às células bacterianas. Resultados semelhantes foram obtidos em outro trabalho [16], cujos autores chegaram a conclusões análogas às obtidas no nosso estudo, embora tenham

testado os sanitizantes sobre biofilmes formados por isolados de *Salmonella* isolados de produtos cárneos.

Os resultados obtidos neste estudo dão suporte à recomendação de que as boas práticas de fabricação adotadas pelas indústrias que processam queijo mussarela de leite de búfala devem incluir medidas específicas para o controle da contaminação por *S. aureus*, considerando a possibilidade de formação de biofilme por parte desses microrganismos sobre superfícies de equipamentos e utensílios que tenham componentes de aço inoxidável, vidro ou polietileno de alta densidade.

CONCLUSÕES

A maioria dos *Staphylococcus aureus* isolada de queijo mussarela de leite de búfala possui a capacidade de formar biofilme nas superfícies de equipamentos e utensílios que tenham componentes de aço inoxidável, vidro ou polietileno de alta densidade. Embora os isolados formadores de biofilme não sejam mais resistentes aos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo do que os não formadores, eles atingem maiores concentrações no biofilme, o que resulta em maiores populações bacterianas remanescentes após a aplicação dos sanitizantes.

MANUFACTURERS

¹Himedia Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai, Índia.

²Nunclon, Nunc. Roskilde, Denmark.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 **Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB). 2016.** Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/laticinios.html>. [Accessed online in June 2017].
- 2 **Andrade N.J., Bridgeman T.A. & Zottola E.A. 1998.** Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*. 61(7): 833-838.
- 3 **Boari C.A., Alves M.P., Tebaldi V.M.R., Savian T.V. & Piccoli R.H. 2009.** Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29(4): 886-895.
- 4 **Brasil. 2003.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. 18 set. 2003. Seção I. Brasília: Diário Oficial da União, pp.14-51.
- 5 **Braem G., De Vliegher S., Supré K., Haesebrouck F., Leroy F. & De Vuyst L. 2011.** (GTG)5-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. *Veterinary Microbiology*. 147: 67-74.
- 6 **Cloete T.E. 2003.** Resistance mechanism of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51(4): 277-282.

- 7 **Coelho S.M.O., Pereira I.A., Soares L.C., Pribul B.R. & Sousa M.M.S. 2011.** Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro. *Journal of Dairy Science*. 94(10): 3305-3310.
- 8 **Cunha S.A. & Cunha R.M. 2007.** Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como elevado potencial patogênico de resistência às drogas. *Revista Saúde & Ambiente*. 2(1): 105-114.
- 9 **Gandra E.A., Fernandez M.A., Silva J.A. & Silva W.P. 2016.** Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. *Revista Ciência Rural*. 46(8): 1418-1423.
- 10 **Janssens J.C.A., Steenackers H., Robijns S., Gellens E., Levin J., Zhao H., Hermans K., Coster D.D., Verhoeven L.T., Marchal K., Vanderleyden J., Vos E.D. & Keersmaelker J.C.S. 2008.** Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(21): 6639-6648.
- 11 **Kasnowski M.C., Mantilla S.P.S., Oliveira L.A.T. & Franco R.M. 2010.** Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de avaliação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 8(15): 1-23.
- 12 **Koelln S.T.F., Mattana A. & Hermes E. 2009.** Avaliação Microbiológica do queijo mussarela e queijo colonial comercializado na região oeste do Paraná. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 3(2): 66-74.
- 13 **Langsrud S., Sidhu M.S., Heir E. & Holck A.L. 2003.** Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51(4): 283-290.
- 14 **Marques C.S., Rezende S.O.G.J., Alves F.A.L., Silva C.B., Alves E., Abreu R.L. & Piccoli H.R. 2007.** Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a alguns sanificantes químicos. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(3): 538-543.
- 15 **Melo P.C., Ferreira L.M., Nader F.A., Zafalon L.F. & Vicente H.I.G. 2012.** Análise fenotípica e molecular da produção de biofilme por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Bioscience Journal*. 28(1): 94-99.
- 16 **Milan C., Agostinetti A., Conceição H.L. & Gonzalez C.D.T. 2015.** Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 6(2): 642-646.
- 17 **Mohapatra B.R., Broersma K. & Mazumder A. 2007.** Comparison of the five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *Microbiology Letters*. 277: 98-106.
- 18 **Nascimento H.M., Delgado D.A. & Barbaric I.V. 2010.** Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. *Revista Ceciliansa*. 2(1): 11-13.
- 19 **Oliveira M.M.M., Brugneta F.D. & Piccoli H.R. 2010.** Biofilmes Microbianos na Indústria de Alimentos: uma revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 69(3): 277-284.
- 20 **Rasschaert G., Houf K., Imberechts H., Grijspeerdt K., De Zutter L. & Heyndrickx M. 2005.** Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(8): 3615-2623.
- 21 **Rodrigues B.L., Santos R.L., Rizzo N.N., Tagliari Z.V., Oliveira P.A., Trenhago G., Rodegheri C.Z., Taglieti M.R., Dickel L.E. & Nascimento R.V. 2009.** Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(3): 225-230.
- 22 **Salimena S.P.A. 2014.** Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Revista CES*. 28(1): 88-102.
- 23 **Sambrook J. & Russel D.W. 2001.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 999p.
- 24 **Santos Junior A.C., Salimenta A.P., Sant'Anna C.M. & Roberta H. 2014.** Action of sanitizers on *Staphylococcus aureus* biofilm on stainless steel and polypropylene surfaces. *African Journal Microbiology Research*. 36(9): 3347-3353.
- 25 **Statistix®. 2003.** *Statistix 8 analytical software*. Tallahassee: Analytical software, Florida, USA.
- 26 **Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. & Svabic-Vlahovic M. 2000.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal Microbiological Methods*. 40(2): 175-179.
- 27 **Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J. & Lupski J.R. 1994.** Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5: 25-40.