

ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA EM LEITE DE BÚFALA REFRIGERADO: ESTUDO PRELIMINAR DA RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS E A PRODUÇÃO DE COAGULASE LIVRE

**ALVES, Mariane Igansi¹; MARIN, Manoela¹, GANDRA, Eliezer Ávila²,
MOTTA, Amanda de Souza³; JANTZEN, Márcia Monks²**

¹ Curso de Bacharelado em Química de Alimentos, UFPEL, Pelotas/RS, Brasil

² Departamento de Ciência dos Alimentos, FAT, UFPEL, Pelotas/RS, Brasil

mjantzen_vet@hotmail.com

³ Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, UFEL, Pelotas/RS, Brasil,

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino tornou-se uma boa opção para produção de leite em função dos altos teores de gordura, proteína e sólidos, o que permite maior rendimento na fabricação de produtos lácteos, especialmente, na elaboração do queijos (BERNARDI et al., 2009). Esse leite apresenta micelas de caseína e glóbulos de gordura maiores, coloração branco-opaca provocada pela ausência de pigmentos carotenóides, sabor adocicado e formação de sabor e aroma menos evidenciado nos produtos derivados, (OLIVEIRA, ALMEIDA & SOUZA, 1997).

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, de formato cocóide e disposta, principalmente, em forma de cachos (FORSYTHE, 2005). *S. aureus* representa um risco para a saúde pública devido à produção de enterotoxinas, agentes causais da intoxicação alimentar (BRASIL, 1993). Existe uma relação entre linhagens enterotoxigênicas de *S. aureus* e linhagens que possuem a enzima coagulase, sendo indicativo de uma correlação entre produção de coagulase e de potencial para geração de enterotoxina, mesmo que a bactéria seja de uma outra espécie que não *S. aureus*. (JAY, 2005).

O método de eleição para enumeração dos estafilococos em alimentos é o de contagem em placas utilizando o Ágar Baird-Parker (ABP). Este ágar combina o telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e cloreto de lítio (0,5%) como agente seletivo e, a redução do telurito de potássio e a hidrólise da gema de ovo como características diferenciais das colônias típicas de estafilococos. Estas últimas apresentam-se negras, brilhantes, delimitadas com dois halos, sendo associadas à capacidade do micro-organismo em produzir a enzima coagulase e, conseqüentemente, ser um potencial produtor de enterotoxina (SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA, 1997).

Objetivou-se com este trabalho realizar um estudo preliminar de quantificação de Estafilococos coagulase positiva (ECP) em leite de búfala utilizado para elaboração de queijos. Além disso, traçar um comparativo entre o comportamento das colônias isoladas em ABP e a produção da enzima coagulase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As 2 amostras de leite “*in natura*” de búfala foram coletadas de um laticínio localizado no Balneário Cassino no Município de Rio Grande/RS e

transportadas em frascos estéreis, em caixas isotérmicas com gelo até o laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel, onde foram realizadas as análises.

A metodologia seguiu as indicações da Portaria 101 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL,1993), sendo que as amostras de leite, após serem diluídas em solução salina (0,85%) de forma decimal, foram semeadas (0,1 mL) sobre a superfície do ABP (Acumedia). As placas foram incubadas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e foram escolhidas as diluições das placas que continham entre 15-150 colônias para a realização da contagem das colônias. Considera-se como colônias típicas aquelas que possuem aspecto circular, de coloração negra brilhante com anel opaco, rodeado por um halo claro transparente e como colônias atípicas aquelas de aspecto acinzentado ou negro brilhante, sem halo ou com apenas um dos halos. De cada placa foram selecionadas 3-5 colônias típicas e atípicas, semeadas em tubos contendo Caldo Infusão de Cérebro e coração (Broth Heart Infusion – BHI, Merck), sendo incubados a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

Em seguida realizou-se a prova da coagulase (BRASIL,1993), transferindo-se 0,3 mL do cultivo de BHI para tubos contendo 0,5 mL de plasma de coelho e estes incubados a 35°C e analisados a cada 30 minutos durante 6 horas, com uma leitura final após 24 horas. Essas primeiras leituras são necessárias para verificar a possível atuação de enzimas proteolíticas, as quais poderiam destruir o coágulo produzido pela enzima coagulase e, desta forma, levar a um resultado falso negativo. No final da análise foi avaliada a intensidade do teste da coagulase, indicado como uma cruz (+) fracamente positivo e quatro cruces (++++) fortemente positivo.

Após a realização do teste da coagulase, aquelas linhagens que apresentaram a produção da enzima, foram repicadas para Ágar Soja Triptona (TSA, Acumedia) para, futuramente, serem estudadas em relação à sua capacidade de produção de enterotoxinas e quanto à capacidade de formar biofilmes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 2 amostras (A1 e A2) de leite analisadas, ambas apresentaram contagem para ECP, sendo que nenhuma das amostras ultrapassou o valor de 10^4 UFC.mL⁻¹, enumerando-se $8,3 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ na amostra 1 e $2,5 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ na amostra 2. Santana et al. (2006), ao analisarem 4 amostras de leite de vaca oriundas da cidade de Pelotas, encontraram contagens maiores que a do presente estudo, onde foi identificado entre 10^5 e 10^6 UFC.mL⁻¹. Embora não exista legislação para pesquisa de ECP em leite cru, contaminações com contagens acima de 10^5 UFC.mL⁻¹ são consideradas um grande problema por aumentar a probabilidade da produção de enterotoxinas (SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA, 1997).

Levando-se em consideração a duplicata das placas, na diluição escolhida para a contagem, nas amostras de leite, foram identificadas 29 colônias típicas. Destas, foram testadas 5 colônias, para a reação da coagulase, sendo que todas (100%) foram positivas ao teste (Tabela 1).

Dentre as colônias atípicas, foram identificadas 375 colônias, das quais 4 foram testadas e 3 destas apresentaram positividade ao teste da

coagulase (75%). A Tabela 2 apresenta as análises realizadas em cada uma das amostras quanto às colônias atípicas.

Tabela 1. Resultados da prova de coagulase obtidos em colônias típicas.

Amostras	Diluição	Placa	CT ¹	C. típicas Test. ²	Intensidade ³	% ⁴
A1	10 ⁻¹	A	1	1	+	100
A1	10 ⁻¹	B	3	2	++	100
A2	10 ⁰	A	25	2	++	100

¹Contagem de colônias típicas; ²Número de colônias típicas testadas; ³Intensidade no teste de coagulase; ⁴% de colônias típicas testadas que apresentaram testes positivo na coagulase.

Tabela 2. Resultados da prova de coagulase obtidos em colônias atípicas.

Amostras	Diluição	Placa	CA ¹	C. atípicas Test. ²	Intensidade ³	% ⁴
A1	10 ⁻¹	A	156	1	+	100
A1	10 ⁻¹	B	136	1	0	0
B2	10 ⁰	A	83	2	++	100

¹Contagem de colônias atípicas; ²Número de colônias atípicas testadas; ³Intensidade no teste de coagulase; ⁴% de colônias atípicas testadas que apresentaram testes positivo na coagulase.

Na confirmação do número de colônias coagulase positiva, para as colônias típicas foi encontrada uma contagem de $8,3 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ de *Staphylococcus* spp. na amostra 1 e $2,5 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ na amostra 2. Quanto à contagem de colônias atípicas e confirmadas no teste da coagulase, na A1 foi identificado 8×10^3 UFC.mL⁻¹ e na A2, $8,3 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹. Esses resultados podem ser visualizados na seguinte tabela:

Tabela 3. Estafilococos coagulase positiva das amostras analisadas.

Amostras	CT (UFC.mL ⁻¹) ¹	CA (UFC.mL ⁻¹) ²	Resultado Final (UFC.mL ⁻¹) ³
1	$8,3 \times 10^3$	8×10^3	$1,6 \times 10^4$
2	$2,5 \times 10^2$	$8,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$

¹Colônias típicas; ²Colônias atípicas; ³Resultado final da amostra.

Santana et al. (2006) relataram que a partir de 51 amostras de leite de diferentes propriedades leiteiras de Londrina, foram isoladas 321 colônias, sendo 115 (35,8%) consideradas típicas de *S. aureus* e 206 (64,2%) atípicas. Das 115 colônias típicas, 74 (64,34%) foram capazes de produzir coagulase, e das 206 atípicas, 86 (41,74%) produziram a enzima. Naquele trabalho, embora grande parte das colônias encontradas em ABP eram atípicas, a maioria das que apresentam coagulase positiva eram colônias típicas, as quais são capazes de produzir intoxicação alimentar.

Os resultados que foram obtidos no presente estudo diferem aos resultados encontrados por Santana et. al. (2006), pois o número de colônias típicas e atípicas que em ambas as amostras apresentaram positividade ao teste da coagulase foi semelhante.

Observou-se na contagem de ECP dos leites analisados no presente trabalho, que o número de colônias típicas e atípicas resultou similar, fato não encontrado pelo outro autor já mencionado, quando pesquisaram a morfologia das colônias produtoras de coagulase em leite bovino. Este resultado

preliminar indica que mais amostras devem ser analisadas para a verificação do perfil do comportamento de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de búfala.

A partir do trabalho realizado, a contaminação inicial por ECP pode indicar o potencial das colônias em produzir toxina, porém nas amostras de leite de búfala não atingiu a enumeração estimada para a produção da mesma através do mecanismo de *quorum sensing*, ou seja, 10^5 UFC.mL⁻¹.

O estudo indica que maior número de amostras devem ser analisadas quanto à enumeração de ECP e quanto a outros aspectos de patogenicidade dos isolados, tais como a produção de toxinas e a formação de biofilmes.

4 CONCLUSÕES

Tratando-se de um estudo preliminar, inicialmente o número de colônias típicas e atípicas que confirmaram positividade no teste da coagulase foram semelhantes, porém é necessário a análise de um grupo amostral maior para podermos de fato inferir que o comportamento de Estafilococos coagulase positiva isolado de leite de búfala possua esse perfil. O índice de contaminação por esse microrganismo em leite de búfala também continuará sendo pesquisado.

5 REFERÊNCIAS

BERNARDI, Maria R. V.; BARROS, Caroline; DIAS, Sabrina; TONHATI, Humberto; GÚZMAN-SILVA, Maria; ARAÚJO, Kátia; BOAVENTURA, Gilson. **Efeito do consumo do queijo mozzarella de leite de búfala no perfil nutricional e sérico de ratos**, Alimentos e Nutrição, v. 20, n. 3, pág. 457-462, Jul/ Set 2009.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária**. Portaria n 101, de 17.08.93. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. 1991/1992 – 2ª. Revisão. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária, 1993.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia de Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAY, James M.. **Microbiologia dos Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OLIVEIRA, G.J.C.; ALMEIDA, A.M.L.; SOUZA FILHO, U.A. **O búfalo no Brasil**. Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia. Cruz das Almas, 1997.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T.C.; MORAES, L.; TIMANINI R.; SILVA W. **Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina A, em amostras isoladas de leite cru refrigerado**, Semina: Ciências Agrárias, v. 27, n. 4, pág. 639- 646, Out/ Dez 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.