

## PESQUISA DE *ESCHERICHIA COLI* E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO QUALITATIVA DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Eduarda Esteves Braga<sup>a</sup>, Julia Maria Portella Lopes<sup>a</sup>, Kaylane Souza Santos de  
Oliveira<sup>a</sup>, Ian Lucas Coelho Araújo Maia<sup>a</sup>, Janaína dos Santos Nascimento<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

### RESUMO

O leite é um potencial veículo de transmissão de *Escherichia coli* e outros micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*, que apresentam diversos fenótipos que propiciam vantagens para sua sobrevivência em um nicho competitivo, mas que podem causar riscos para a saúde dos consumidores de produtos lácteos, principalmente aqueles imunocomprometidos. O objetivo inicial deste trabalho foi avaliar a presença de *E. coli* e a produção qualitativa de biofilme pelos isolados obtidos em amostras de leite pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro. Não foi detectada a presença de *E. coli* em nenhuma das amostras de conveniência analisadas, no entanto, foram encontrados isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em duas amostras, com contagens acima do permitido pela legislação vigente. Nenhum desses isolados foi produtor de biofilme, porém essa característica foi exibida por três isolados pertencentes a outros grupos. O presente estudo evidencia que, mesmo passando pelo processo de pasteurização, muitos micro-organismos podem sobreviver no leite e garantir sua permanência nesse produto, como por exemplo, por meio da produção de biofilme, acarretando na diminuição da qualidade do produto e, muitas vezes, em riscos para a segurança do consumidor.

**Palavras-chave:** leite pasteurizado, família *Enterobacteriaceae*, biofilme.

## 1. INTRODUÇÃO

A agropecuária é uma das atividades econômicas mais importantes para o Brasil, com ênfase para o abate bovino e a extração de leite de vacas. Em todo o ano de 2021, a média de cabeças de bovinos para abate, segundo o IBGE, foi de 27,54 milhões de animais, enquanto que a aquisição de leite cru acumulada, no mesmo ano, foi de 25,08 bilhões de litros (IBGE, 2022).

O leite e seus derivados são extremamente consumidos por toda a população, sendo necessários, portanto, cuidados com a fiscalização e o controle de qualidade. Uma vez que esses alimentos possuem alto teor nutricional, se tornam-se, também, um meio de cultura valioso, podendo ser facilmente contaminado por diversos micro-organismos (Pereira & Scussel, 2017; Calahorrano-Moreno *et al.*, 2022).

Embora a pasteurização consista, de maneira simplificada, em um tratamento térmico, com o objetivo de eliminar possíveis micro-organismos patogênicos prejudiciais à saúde humana, muitos micro-organismos, entre eles a *Escherichia coli*, podem sobreviver a esse processo e estarão viáveis no leite pasteurizado que chega à mesa do consumidor. A ocorrência de *E. coli* em número elevado, principalmente em alimentos frescos, de validade curta e de origem animal, indica manipulação em condições precárias de higiene ou armazenamento inadequado (Franco *et al.*, 2013; Mulinari *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2019).

A contaminação pode ser originada do próprio animal, ou até mesmo do processo de ordenha. Pode ocorrer, em casos de ordenha manual, a contaminação oriunda das mãos do ordenhador, e em casos de ordenha mecanizada, apesar de mais segura, pode ocorrer a contaminação da máquina por má higiene, entre outros (Campos *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2019). Além disso, fatores como a possível contaminação nas tetas da vaca, pode prejudicar e contaminar todo o leite e outros animais. Ainda é necessário apontar a contaminação dos alimentos que esses animais consomem, o que também pode levar à presença de micro-organismos no produto final. Vale ressaltar o fato de que a presença de *E. coli* indica contaminação fecal, que pode ser um indicativo de contaminação cruzada oriunda de más práticas higiênico-sanitárias, visto que, em uma produção padrão de leite pasteurizado em

boas condições higiênico-sanitárias não deve haver contato direto nem indireto com dejetos fecais (Catão & Ceballos, 2001; Adzitey *et al.*, 2022).

A Instrução Normativa N°60 de 2019, legislação vigente que preconiza os padrões microbiológicos para alimentos, não estabelece limites para a presença de *E. coli* em leite pasteurizado, no entanto, determina que seja realizada a análise de membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo que nenhuma unidade amostral pode apresentar resultado maior que 10 UFC/mL (Brasil, 2022). É importante lembrar que a *E. coli* é um membro da família *Enterobacteriaceae*.

*E. coli* representa um grande risco para a saúde e o bem-estar do consumidor, visto que pode causar infecções gastrointestinais em seres humanos. A contaminação pode gerar desde uma simples intoxicação alimentar, até problemas mais graves (Batista *et al.*, 2014; Abebe *et al.*, 2020). Além disso, os biofilmes produzidos por *E. coli* na embalagem do leite pasteurizado, auxiliam a prolongar a permanência e a proteger esses e outros micro-organismos presentes (Sharma *et al.*, 2016).

Biofilmes são um conjunto de micro-organismos emaranhados em uma matriz de polímero orgânico que estão aderidos a uma superfície. Os biofilmes são formados pela deposição e adesão de microrganismos em uma superfície de contato, formando uma matriz de exopolissacarídeos (EPs), onde iniciam seu crescimento (Qasim, 2018; Siqueira *et al.*, 2021). A formação de biofilmes auxilia na conservação e no aumento da quantidade de bactérias no alimento. No ponto de vista qualitativo, biofilmes simbolizam problemas graves na indústria de alimentos, haja vista que indicam grande contaminação. Isso acontece, pois, os biofilmes, mesmo que tenham como característica a adesão ao alimento ou as superfícies de embalagens ou equipamentos, muitas vezes podem se soltar e espalhar as bactérias, ampliando assim a contaminação. Além disso, micro-organismos em biofilme podem sobreviver a diversas medidas de sanitização, o que torna ainda mais difícil a descontaminação (Tasneem *et al.*, 2018; Ramos & Nascimento, 2021).

Sabendo-se do alto consumo e das consequências da contaminação do leite pasteurizado por *E. coli*, torna-se clara a necessidade de uma fiscalização efetiva e frequente desse produto. De modo a contribuir com a avaliação da qualidade de

amostras de leite pasteurizado comercializadas na Zona Norte da cidade do Rio de Janeiro, o presente estudo teve como objetivo inicial detectar a presença de *E. coli* e avaliar a produção qualitativa de biofilme por esses isolados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas amostras de conveniência de leite pasteurizado, adquiridas a partir de estabelecimentos comerciais da cidade do Rio de Janeiro. A coleta de amostras foi realizada no mês de junho de 2022, e estas foram mantidas em refrigeração e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do IFRJ para as análises.

### 2.2 PESQUISA DE *ESCHERICHIA COLI* NAS AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO

Para a análise qualitativa das amostras de leite pasteurizado, foi realizada a metodologia definida pela ISO 16649-2 (ISO, 2001). De cada amostra, foram retirados 25 mL para diluição em 225 mL de água peptonada a 0,1% (p/v). Em seguida, foram realizadas mais duas diluições sucessivas, em tubos de ensaio contendo o mesmo diluente. Após as diluições, o plaqueamento foi realizado por "pour plate" em ágar TBX (Tryptone-Bile-X-Glucuronide) e em duplicata. As placas foram então incubadas à 44°C por 24 horas. Colônias típicas de *E. coli*, que apresentam coloração azulada neste meio de cultura, foram selecionadas para a avaliação da produção de biofilme. Colônias atípicas também foram selecionadas.

### 2.3. CARACTERIZAÇÃO INICIAL DE ISOLADOS ATÍPICOS

Diferentes colônias atípicas, foram transferidas para placas contendo ágar nutriente, e incubadas à 37°C por 18-24 horas. Para diferenciação desses isolados, como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* ou ao gênero *Pseudomonas*, foi realizada a inoculação dos mesmos tanto em meio ágar VRBG ("violet red bile glucose") como em ágar Cetrimida. As placas foram incubadas a 36°C por 18-24 horas.

### 2.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Para a avaliação qualitativa da produção de biofilme, os isolados típicos e atípicos foram estriados sobre a superfície de ágar vermelho Congo, elaborado a

partir de 15 g/L de ágar nutriente, 37 g/L de sacarose e 0,8 g/L de vermelho congo, conforme descrito por Freeman e colaboradores (1989), com incubação à 37°C por 24 horas. Com esse procedimento, as colônias produtoras de biofilme se apresentam com coloração negra.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na maior parte dos estabelecimentos na cidade do Rio de Janeiro, principalmente na Zona Norte, não há diversidade de marcas de leite pasteurizado, sendo, então, encontradas poucas marcas sendo comercializadas (Machado, 2021). As amostras obtidas neste trabalho foram encontradas nas padarias e alguns bairros onde se têm um público fiel ao produto. Neste trabalho, portanto, foram analisadas cinco amostras de conveniência, obtidas em cinco estabelecimentos comerciais diferentes. Nenhuma das amostras estudadas apresentou colônias típicas azuis no ágar TBX, indicando, portanto, a ausência de *Escherichia coli* (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Quantificação de *Escherichia coli* e de colônias atípicas nas amostras de leite pasteurizado analisadas.

	Quantificação (UFC/ml)	
	Colônias típicas crescidas no ágar TBX (azuis)	Colônias atípicas crescidas no ágar TBX (brancas)
Amostra 1	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	7,5 x 10 <sup>1</sup>
Amostra 2	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	4,0 x 10 <sup>1</sup>
Amostra 3	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
Amostra 4	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
Amostra 5	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>

Duas amostras, no entanto, denominadas 1 e 2, apresentaram uma grande quantidade de colônias atípicas, de coloração branca (**Tabela 1**). De acordo com diferentes fabricantes do ágar TBX, colônias brancas crescidas neste meio podem geralmente pertencer a membros do gênero *Pseudomonas*, como a outros membros da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Citrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enterica*. Já foi descrito, no entanto, que nem todas as *E. coli* produzem β-D-glucuronidase, como por exemplo, o sorotipo O157:H7, que também pode formar colônias brancas (Mäde *et al.*, 2017; Labkem, 2022).

Para fins de diferenciação entre elas, as colônias brancas foram inoculadas em ágar cetrimida e em ágar VRBG. Dos 52 isolados de coloração branca obtidos no ágar TBX, nenhum apresentou crescimento no ágar cetrimida e trinta e dois não cresceram em nenhum dos dois meios de cultura, indicando que possam pertencer a outros grupos. No entanto, 20 (38,5%) isolados, sendo 4 originados da amostra 2 e 12 da amostra 1, cresceram no ágar VRBG, apresentando coloração rosa (**Tabela 2**). Esses resultados sugeriram, portanto, que esses isolados de coloração rosa seriam pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Para confirmação, os mesmos foram submetidos aos testes de fermentação da glicose com produção de gás e à produção da enzima oxidase, conforme descrito pela ISO 21528-2 (ISO, 2004), e apresentaram resultados condizentes à família *Enterobacteriaceae*.

Embora não tenha sido o objetivo inicial do trabalho, 38,5% dos isolados atípicos analisados mostraram ser pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Levando em consideração essa proporção e o número de UFC/ml encontrado para as amostras 1 e 2, essas amostras estariam com contagens desses micro-organismos acima da máxima permitida, uma vez que a legislação vigente de padrões microbiológicos para alimentos, a Instrução Normativa nº 161 de 2022 (Brasil, 2022), afirma que a contagem de *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado não pode ultrapassar 10 UFC/mL.

A família *Enterobacteriaceae* engloba diversas bactérias, em sua maioria patógenos, que agem, prevalentemente, no trato gastrointestinal. Além disso, vale ressaltar que uma característica comum presente nas bactérias dessa família é a resistência a antibióticos, que dificulta ainda mais o tratamento contra esses patógenos e evidencia a relevância do descumprimento das leis que abrangem a presença dessas bactérias em leites (Ramos & Nascimento, 2021).

**Tabela 2.** Características dos isolados atípicos (coloração branca) crescidos em ágar TBX

Isolado	Crescimento em ágar VRBG (coloração)	Crescimento em ágar cetrimida	Produção qualitativa de biofilme	Isolado	Crescimento em ágar VRBG (coloração)	Crescimento em ágar cetrimida	Produção qualitativa de biofilme
1	+ (rosa)	-	-	27	-	-	+
2	+ (rosa)	-	-	28	-	-	-
3	+ (rosa)	-	-	29	-	-	+
4	+ (rosa)	-	-	30	-	-	-
5	+ (rosa)	-	-	31	-	-	-
6	+ (rosa)	-	-	32	-	-	-
7	+ (rosa)	-	-	33	-	-	-
8	+ (rosa)	-	-	34	-	-	-
9	-	-	-	35	-	-	-
10	-	-	-	36	-	-	-
11	-	-	-	37	-	-	-
12	-	-	-	38	-	-	-
13	+ (rosa)	-	-	39	-	-	-
14	+ (rosa)	-	-	40	-	-	-
15	+ (rosa)	-	-	41	-	-	-
16	+ (rosa)	-	-	42	-	-	-
17	+ (rosa)	-	-	43	-	-	-
18	+ (rosa)	-	-	44	-	-	-
19	+ (rosa)	-	-	45	-	-	-
20	+ (rosa)	-	-	46	-	-	-
21	+ (rosa)	-	-	47	-	-	-
22	+ (rosa)	-	-	48	-	-	-
23	+ (rosa)	-	-	49	-	-	-
24	+ (rosa)	-	-	50	-	-	-
25	-	-	+	51	-	-	-
26	-	-	-	52	-	-	-

Já as amostras 3, 4 e 5 não apresentaram contagem de *Enterobacteriaceae*. Com isso, pode-se inferir que essas amostras de leite tiveram provavelmente, cuidados higiênico-sanitários adequados, de modo a evitar a proliferação desses micro-organismos, garantido maior qualidade e segurança ao produto.

A produção qualitativa de biofilme dos isolados encontrados também foi avaliada. Somente três isolados (25, 27 e 29) mostraram-se produtores de biofilme (**Tabela 2; Figura 1**). Nenhum deles foi pertencente à família *Enterobacteriaceae*. A identificação desses isolados produtores será realizada posteriormente. A presença de bactérias produtoras de biofilmes no leite pasteurizado indica, na maioria das vezes, um problema na qualidade desse produto e, muito provavelmente, deficiência nas operações higiênico-sanitárias da produção, que acarreta na persistência da

contaminação e, conseqüentemente, uma diminuição na vida útil do produto e risco à saúde do consumidor (Siqueira *et al.*, 2021).



**Figura 1:** Produção de biofilme em ágar vermelho congo. À esquerda, isolado não-produtor e à direita, isolado produtor.

#### 4. CONCLUSÃO

Embora a pasteurização do leite seja empregada para garantir ao consumidor um leite seguro, os resultados obtidos neste estudo mostraram a presença de membros da família *Enterobacteriaceae* e de outros grupos bacterianos. Além disso, foi observada a produção de biofilmes por alguns isolados. Vale destacar que, em duas amostras, a quantificação de *Enterobacteriaceae* presente nas amostras ultrapassou o limite estabelecido pela legislação.

O presente estudo evidenciou que, mesmo não sendo encontrada *Escherichia coli*, alvo inicial deste estudo, há a necessidade de fiscalizações frequentes do leite pasteurizado a ser disponibilizado no mercado, a fim de evitar a redução da vida de prateleira desses alimentos e, ainda mais relevante, enfermidades aos consumidores devido à presença de possíveis patógenos. Por outro lado, os consumidores devem estar atentos a essa possibilidade de contaminação e evitar o consumo do leite pasteurizado sem prévio aquecimento ou fervura.

## 5. REFERÊNCIAS

- Abebe, E.; Gugsu, G.; Ahmed, M. (2020). Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 2020: 4674235.
- Adzitey, F.; Yussif, S.; Ayamga, R.; Zuberu, S.; Addy, F.; Adu-Bonsu, G.; Huda, N.; Kobun, R. (2022). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Escherichia coli* recovered from milk and related samples. *Microorganisms*, 10 (7): 1335.
- Batista, A. S.; Soares, L. S.; Santos, E. S. V.; Silva, M. H. (2014). *Escherichia coli* O157:H7 em leite produzido no Brasil. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 8 (2): 87-111.
- Brasil (2022). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. *Diário Oficial da União*, nº 126, de 6 de julho de 2022.
- Catão, R. M. R.; Ceballos, B. S. O. D. (2001). *Listeria* spp.; coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). *Food Science and Technology*, 21: 281-287.
- Calahorrano-Moreno, M. B.; Ordoñez-Bailon, J. J.; Baquerizo-Crespo, R. J.; Dueñas-Rivadeneira, A. A. B. S. M.; Montenegro, M. C.; Rodríguez-Díaz, J. M. (2022). Contaminants in the cow's milk we consume? Pasteurization and other technologies in the elimination of contaminants. *F1000Research*, 11:91.
- Franco, M. M. J.; Paes, A. C.; Ribeiro, M. G.; Figueiredo-Pantoja, J. C.; Santos, A. C. B.; Miyata, M.; Leite, C. Q. J.; Mota, R. G. ; Listoni, F. J. P (2013). Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of São Paulo. Brazil. *BMC Veterinary Research*, 9 (1): 1–8.
- Freeman, D. J.; Falkiner, F. R. & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*, 42: 872-847.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de->

[noticias/releases/33211-em-2021-abate-de-bovinos-cai-pelo-segundo-ano-seguido-e-o-de-frangos-e-de-suinos-batem-recordes](#)

International Organization for Standardization (ISO). ISO 21528-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: colony count method. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.

International Organization for Standardization (ISO) - ISO 16649-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide. Geneva: International Organization for Standardization; 2001.

Labchen (2022). Technical data sheet Tryptone-Bile-X-Glucuronate (TBX) agar. Disponível em: [https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/docs/01977\\_doc24.pdf](https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/docs/01977_doc24.pdf). Acesso em 16 de julho de 2022.

Machado, M. A. A. (2021). *Caracterização de Staphylococcus sp. e outros cocos Gram positivos isolados de leite pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Brasil.

Mäde, D.; Geuthner, AC.; Imming, R.; Wicke, A, (2017). Detection and isolation of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* in flour in Germany between 2014 and 2017. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 12: 245–253.

Mulinari, E. L.; Rosolen, M. D.; Adami, F. S. (2017). Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado produzido no Rio Grande do Sul. *Revista Caderno Pedagógico*, 14 (1):28–35.

Pereira, M. N; Scussel, V. M. (2017). Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle Antimicrobial residues in dairy milk: contamination source, impacts and control. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 16 (2): 170-182.

Ramos, G. L. P. A.; Nascimento, J. S. (2021). Antibiotic resistance profile and detection of degradative enzymes by *Enterobacteriaceae* isolated from raw goat milk. *Germes*, 11 (2): 211-220.

Sharma, G.; Sharma, S.; Sharma, P.; Chandola, D.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2): 309-319.

Siqueira, I. N.; Limeira, C. H.; Cavalcanti, A. A. C.; Souza, J. G. S.; Azevedo, S. S.; Melo, M. A.; Freire, D. H. F. (2021). Bactérias Formadoras de Biofilmes na Indústria de Laticínios: uma Breve Revisão. *Ensaios e Ciência*, 25 (4): 491-500.

Tasneem, U.; Yasin, N.; Nisa, I.; Shah, F.; Rasheed, U.; Momin, F.; Zaman, S.; Qasim, M. (2018). Biofilm producing bacteria: A serious threat to public health in developing countries. *Journal of Food Science and Nutrition*, 1 (2): 25-31.

Weber, M.; Liedtke, J.; Plattes, S.; Lipski, A. (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and-independent methods. *PLoS One*, 14 (9): 1–21.