

Antagonismo entre os Microrganismos Eficientes e a bactéria *S. aureus* da Mastite

Antagonism between Effective Microorganisms and S. Aureus Mastitis bacteria

Beatriz Thomas Metzner*, Deborah Catharine de Assis Leite†, Alex Batista Trentin‡, Scheila Mara Varaschini§, Naiana Cristine Gabiatti¶

RESUMO

A mastite é a infecção das glândulas mamárias em bovinos, sendo um dos maiores motivos de perdas na produção leiteira tanto para o produtor quanto para a indústria. Um dos principais agentes etiológicos da mastite é a bactéria *Staphylococcus aureus*. Entretanto, a fim de evitar o uso de antibióticos no tratamento, uma das alternativas que se destaca são os Microrganismos Eficientes (EMs), que são comunidades microbianas benéficas. Assim, o objetivo desta pesquisa é avaliar a atividade antagonica entre a bactéria causadora da mastite bovina, *S. aureus*, e os EMs. O ensaio de antagonismo quantitativo envolveu as células bacterianas em contato com os EMs, e a análise do crescimento foi feita pela contagem de colônias. Já o ensaio qualitativo, por difusão em discos embebidos nos metabólitos dos EMs colocados em contato com a bactéria, para formação de halos no crescimento. A partir do ensaio qualitativo, não houve formação de halos no crescimento bacteriano, indicando que apenas os metabólitos não são suficientes para o efeito antagonico. O ensaio de antagonismo por meio do contato direto demonstrou que não houve redução no crescimento bacteriano, sendo necessárias mais pesquisas para avaliar esta atividade antagonica entre a *S. aureus* e os Microrganismos Eficientes.

Palavras-chave: patógenos, antagonismo microbiano, bovinos.

ABSTRACT

Bovine mastitis is an infection of the mammary glands, it's one of the biggest causes of losses for the milk production and industry. The most common etiologic agent causing mastitis is the bacteria *Staphylococcus aureus*. However, in order to avoid the use of antibiotics while treating bovine mastitis, one interesting alternative are the Effective Microorganisms (EMs), which are beneficial microbial communities. Hence, the objective of this study is evaluate the antagonist activity between the bovine mastitis etiologic agent, *S. aureus*, and the EMs. The quantitative experiment was done with bacterial cells in contact with the EMs. In another hand, the qualitative experiment was the disc diffusion test, with the EMs metabolites in contact with bacterial cells. From the disc diffusion experiment, there was not a zone of inhibition formation, what implies that only the secondary metabolites are not sufficient for the antimicrobial effect. Moreover, the quantitative experiment, through the direct contact between bacterial cells and EMs, demonstrated no reduction in the bacterial growth, indicating that more researches are necessary to evaluate the antagonist effect between the bacteria *S. aureus* and Effective Microorganisms.

Keywords: pathogens, microbial antagonism, bovine.

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; beatriztmetzner@hotmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; deborahleite@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; a.trentinx@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; varaschini@alunos.utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; naianagabiatti@utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

A mastite é caracterizada pela inflamação das glândulas mamárias em bovinos, sendo um dos maiores problemas na pecuária mundial. Essa doença se espalha facilmente dentre os animais em um mesmo rebanho, e pode se apresentar de duas maneiras distintas: mastite clínica, quando o animal possui sintomas como edemas, aumento da temperatura, dor e sensibilidade no úbere; enquanto a mastite subclínica é extremamente sutil, uma vez que os sintomas não são identificados (DA FONSECA, 2020). Assim, um dos principais motivos da importância desta doença é a dificuldade de realizar o diagnóstico precoce, especialmente nos casos da doença na forma subclínica, e, conseqüentemente, aplicar um tratamento eficaz para a infecção; os métodos mais comuns para diagnosticar a mastite bovina são California Mastitis Test (CMT), a Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite, Teste da caneca de fundo escuro, Wisconsin Mastitis Test (WMT), e a análise microbiológica do leite (MAIOCHI, 2019).

Atualmente o Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo, sendo que os estados com maior produção são Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (MALISZEWSKI, 2020), com produção anual total estimada em 34,3 bilhões de litros, de acordo com os dados de 2019. Entretanto, a ocorrência da mastite no gado gera perdas expressivas na produção, tanto pelo gasto com medicamentos e serviços especializados, quanto pela perda de animais no rebanho e necessidade de descarte do leite, uma vez que o leite produzido pelas vacas infectadas não pode ser comercializado pela baixa qualidade que possui. Aliás, é relevante ressaltar que as perdas não se restringem ao produtor, mas também prejudicam economicamente todo o setor do laticínio; visto que a baixa na quantidade de litros comercializados pelo produtor resulta em uma redução na quantidade de leite produzido pela indústria, não conseguindo suprir a demanda e supervalorizando o produto; além do risco de que o leite vindo do produtor tenha uma concentração elevada de toxinas produzidas pelas bactérias infecciosas, as quais nem sempre conseguem ser eliminadas com processos convencionais de pasteurização, acarretando em riscos à saúde humana pelo produto final (MAIOCHI, 2019).

Existem diversos agentes causadores da mastite bovina; os dois principais são as bactérias *Escherichia coli* e a *Staphylococcus aureus*, ambas já amplamente conhecidas por causar doenças em humanos. Tais bactérias patogênicas geralmente estão relacionada com a mastite subclínica, quando não há alteração na aparência do leite (CREMONESI, 2006). Historicamente, o tratamento da mastite é realizado pelo uso de antibióticos nos animais infectados, porém, algumas questões têm chamado atenção para a tentativa de buscar alternativas no manejo da mastite bovina, entre elas: o ganho de resistência aos antibióticos pelos microrganismos, o alto custo desses medicamentos para o produtor, a queda na qualidade e a presença dos antibióticos no leite comercializado para consumo humano, além da redução da qualidade de vida dos animais (PIEPERS, 2018). Entre as alternativas já descritas para o tratamento ou prevenção da mastite, encontram-se a aplicação de vacinas (PIEPERS, 2018), uso de metabólitos (substâncias com efeitos antimicrobianos produzidas por outros microrganismos) (KIM, 2010), bacteriófagos (KWiatek, 2012) e também o uso de Microrganismos Eficientes (EMs) (HAMAD, 2019).

Os Microrganismos Eficientes (EMs) são um conjunto de diferentes microrganismos, descobertos na década de 90 pelo professor Teruo Higa, da Universidade de Ryukyus no Japão (HIGA; PARR, 1994). Essas comunidades microbianas são comumente constituídas por bactérias ácido-láticas, leveduras e bactérias fotossintetizantes, todos microrganismos não patogênicos, não modificados geneticamente nem processos, ou seja, benéficos e de ocorrência natural em solos férteis e plantas (HAMAD, 2019). Os estudos com os EMs são abrangentes, de melhoramento dos solos e da produtividade agrícola, até o tratamento de efluentes e biorremediação, além da atividade antimicrobiana contra alguns patógenos. Sabendo que a mastite afeta

drasticamente a os animais e a produção leiteira, e que os EMs apresentam diversas funções benéficas, será que existe o efeito de antagonismo entre os EMs e a bactéria *Staphylococcus aureus*?

Desse modo, esta pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade antagonista entre o agente causador da mastite bovina, a bactéria *Staphylococcus aureus*, e os Microrganismos Eficientes *in natura* e pelos seus metabólitos.

2 MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Ensino de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, na cidade de Dois Vizinhos, Paraná (UTFPR-DV).

2.1 Isolamento da bactéria

Inicialmente, a bactéria *Staphylococcus aureus* foi isolada a partir do leite de vacas infectadas, diagnosticadas com a mastite da Fazenda Experimental Modelo da UTFPR-DV. A partir de um isolamento inicial, foi feito um esgotamento a fim de isolar uma única colônia, e a coloração de gram para identificar aquela cepa. Esta única colônia foi cultivada em 50mL de Caldo Nutriente a 37°C a 150rpm por 24 horas.

2.2 Ensaio quantitativo de antagonismo

O ensaio quantitativo de antagonismo do EM 5, previamente produzido pelo grupo de Ecologia e Biotecnologia Microbiana (E-BioM), e *S. aureus* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hamad (2020), com as alterações descritas a seguir. Primeiro foram preparados 15 tubos de ensaio com 9 mL de caldo nutriente cada, e os EMs nas seguintes concentrações: 0% (controle), 0,5%, 1%, 2% e 5%, todos em triplicata. Em seguida, foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana em cada tubo preparado, completando 10 mL em cada tubo.

- Tubo 01 (controle): 9 mL de CN + 1 mL de células;
- Tubo 02 (0,5%): 9 mL de CN + 5 µL de EM + 1 mL de células;
- Tubo 03 (1%): 9 mL de CN + 10 µL de EM + 1 mL de células;
- Tubo 04 (2%): 9 mL de CN + 20 µL de EM + 1 mL de células;
- Tubo 05 (5%): 9 mL de CN + 50 µL de EM + 1 mL de células.

Para as diluições seriadas, foram utilizados microtubos de 2 mL contendo 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e 1 mL das soluções de cada tubo, para diluições entre 10^{-1} e 10^{-6} . Entretanto, apenas as diluições de 10^{-5} e 10^{-6} foram escolhidas para analisar os resultados obtidos, pois apresentaram entre 30 e 300 colônias por placa.

Por fim, 50µL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram adicionados às placas de Petri contendo meio de cultura Sal-Manitol, sendo feito o espalhamento com alça de Drigalski. Cada diluição também foi feita em triplicata. Os microrganismos foram incubados por 24 horas a temperatura de 37°C, e posteriormente foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

2.3 Teste de difusão em discos

No ensaio qualitativo de antagonismo, ou seja, o teste de difusão em discos, entre as células de *S. aureus* e os metabólitos dos EMs, iniciou com o preparo dos filtrados: todos os 7 EMs foram transferidos para

microtubos de 2 mL e, estes, centrifugados a 3000 rpm por 2,5min. Então, utilizando uma seringa (0,22µM) estéril acoplada com um filtro, o sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo, e armazenado entre 2 – 8°C.

Este ensaio foi realizado de duas maneiras: espalhamento das células bacterianas e posterior adição dos discos, e pela técnica do *pourplate*, seguido da adição dos discos embebidos na solução de metabólitos dos EMs. Para o espalhamento, foram preparadas 7 placas de Petri contendo meio de cultivo Sal-Manitol, nas quais foram adicionados 50 µL da suspensão de células de *S. aureus*, espalhadas com a alça de Drigalski. Para o *pourplate*, foram adicionados 100 µL das células bacterianas em cada uma das 7 placas de Petri, e em seguida, foi despejado o meio de cultura PCA. Os discos foram feitos de papel filtro e autoclavados por 15 minutos a 121°C e 1,5 atm; depois cada disco foi embebido com 20 µL das soluções filtradas de cada EM. Então, três discos respectivos ao mesmo EM foram colocados nas placas sobre o meio de cultura, tanto para o espalhamento quanto para o *pourplate*. Todas as placas de Petri foram armazenadas em estufa a 37°C por 24 horas, para posterior observação da formação de halos no crescimento bacteriano ao redor dos discos.

Os dados numéricos obtidos a partir da contagem de colônias nas diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram anotados em planilha do Microsoft Excel, e os valores foram convertidos para a unidade de UFC/mL, utilizando a Equação (1), considerando que o volume de solução adicionado nas placas como 50 µL.

$$\frac{\text{Número de colônias} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume}} \quad (1)$$

O programa GraphPad Prism 8 foi utilizado para plotar um gráfico de comparação entre as médias do crescimento bacteriano, conforme o aumento da concentração dos EMs.

3 RESULTADOS

Após a contagem de unidades formadoras de colônias no ensaio quantitativo, os valores encontrados para o crescimento bacteriano em contato com os Microrganismos Eficientes, em diferentes concentrações, estão descritos conforme a Tabela 1. Os resultados encontrados não revelam um padrão de redução no crescimento bacteriano conforme o aumento da concentração dos EMs, como era esperado e de acordo com o descrito por Hamad (2020).

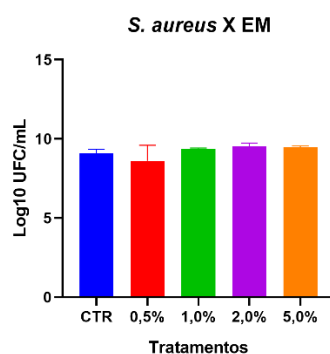
Tabela 1 – Valores para o crescimento de *S. aureus*.

Bactéria	Concentração de EM (v/v)	Contagem (UFC/mL)	Log 10 UFC/mL
<i>S. aureus</i>	0,5%	$1,27 \times 10^9 (\pm 1,01 \times 10^9)$	8,61 ($\pm 0,99$)
	1%	$2,37 \times 10^9 (\pm 2,51 \times 10^8)$	9,37 ($\pm 0,05$)
	2%	$3,30 \times 10^9 (\pm 1,95 \times 10^9)$	8,47 ($\pm 0,19$)
	5%	$3,06 \times 10^9 (\pm 5,17 \times 10^8)$	9,48 ($\pm 0,07$)
	0 % (controle)	$1,38 \times 10^9 (\pm 5,92 \times 10^8)$	9,08 ($\pm 0,26$)

Fonte: autoria própria (2021).

A partir do programa GraphPad Prism 8, todos os dados obtidos para valores em Log10 UFC/mL do crescimento microbiano para cada um dos tratamentos realizados, foram plotados em um gráfico de médias com desvio padrão, apresentado na Figura 1.

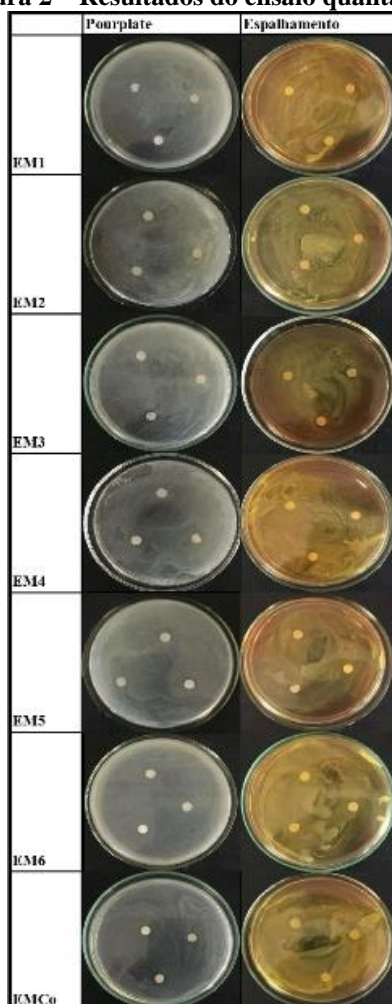
Figura 1 – Média e desvio padrão do crescimento bacteriano em cada tratamento.



Fonte: autoria própria (2021).

Para o ensaio qualitativo, não foi observada formação de halos no crescimento de *S. aureus* na presença do extrato filtrado dos 7 EMs coletados. A Figura 2 mostra os resultados obtidos neste ensaio. Nesse caso, como o contato foi feito entre as bactérias e os EMs filtrados, os resultados mostraram que os metabólitos dos EMs não são suficientes para causar um efeito antimicrobiano significativo, isso significa que seria necessária uma quantidade muito maior desse filtrado para ser notada a atividade de antagonismo.

Figura 2 – Resultados do ensaio qualitativo.



Fonte: autoria própria (2021).

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que o EM5 utilizado não apresentou efeito antagonista direto contra a bactéria *S. aureus*; tampouco foram observados efeitos antagonistas dos metabólitos secundários dos 7 EMs contra a *S. aureus*. Desse modo, ainda é necessário que sejam desenvolvidas mais pesquisas, tendo como objetivo a avaliação da atividade antagônica entre os EMs e as bactérias causadoras da mastite bovina. Apesar do resultado observado ter sido diferente da hipótese proposta, concluiu-se que este estudo contribui para as pesquisas na área de alternativas para o tratamento da mastite bovina, abrindo oportunidades para os demais pesquisadores.

REFERÊNCIAS

- HIGA, Teruo; PARR, James F. **Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment**. Atami: International Nature Farming Research Center, 1994.
- HAMAD, Mohammad A. et al. **The inhibitory role of effective microorganisms on the growth of pathogenic bacteria**. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, v. 34, n. 1, p. 153-158, 2020.
- CREMONESI, P. et al. **Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk**. Journal of Dairy Science, v. 89, n. 1, p. 163-169, 2006.
- PIEPERS, Sofie; DE VliegHER, Sarne. **Alternative approach to mastitis management—How to prevent and control mastitis without antibiotics?**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 55, n. 3, p. e137149-e137149, 2018.
- DA FONSECA, Maria Eduarda Barbosa et al. **Mastite bovina: Revisão**. PUBVET, v. 15, p. 162, 2020.
- MAIOCHI, Rafaela; RODRIGUES, Raquel; WOSIACKI, Sheila. **Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos**. Enciclopédia Biosfera, v. 16, n. 29, 2019.
- KWIATEK, Magdalena et al. **Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against Staphylococcus aureus strains**. Archives of Virology, v. 157, n. 2, p. 225-234, 2012. doi: 10.1007/s00705-011-1160-3.
- KIM, S. Y. et al. **In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by Staphylococcus species isolated from bovine mastitis**. Journal of dairy science, v. 93, n. 8, p. 3610-3615, 2010.
- MALISZEWSKI, Eliza. **Dia Mundial do Leite: os desafios da cadeia**. Agrolink, 2020. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/noticias/dia-mundial-do-leite--os-desafios-da-cadeia_434701.html>. Acesso em: 21 ago. 21.