

HABILIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA DE SHIGA (STEC) PROVENIENTES DE CORAÇÕES E CORTES SUÍNOS

PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES¹; LAÍS ABREU ANASTÁCIO²; DIEGO PERES ÁVILA²; ISABELA SCHNEID KRONING²; GRACIELA VÖLZ LOPES²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – anastacio.alais@gmail.com; diiperes1@gmail.com; isabelaschneid@gmail.com; gracielaavlopes@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae* e possui como habitat primário a microbiota do trato intestinal de animais e humanos. No entanto, a presença de fatores de virulência, como toxinas e adesinas, permite a sua sobrevivência em outros ambientes e, em alguns casos, podem causar doenças graves em seus hospedeiros (FRAZÃO et al., 2019; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Determinadas linhagens patogênicas de *E. coli* podem causar infecções no trato intestinal e infecções extraintestinais (MENG et al., 2013). O patótipo *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), pertencente ao grupo de *E. coli* diarreiogênicas, se destaca pela capacidade de causar sintomas que incluem diarreia aquosa, diarreia com sangue, colite hemorrágica e outras complicações graves, como a síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), que podem ocasionar o óbito (BOLTON, 2011).

Os animais ruminantes, principalmente bovinos, são considerados os principais reservatórios naturais de *E. coli* patogênica e a principal fonte de contaminação de alimentos. As espécies animais também podem se contaminar com esse micro-organismo e transportá-lo no trato gastrointestinal como portadores assintomáticos. Se houver alguma falha na cadeia de produção, pode ocorrer contaminação do ambiente de abate e processamento, e essas bactérias podem se disseminar e contaminar o produto final (ISLAM et al., 2008; XIA et al., 2010).

A capacidade de formar biofilme é um importante mecanismo de sobrevivência de micro-organismos patogênicos. O biofilme pode ser formado em diversas superfícies, as quais podem apresentar contato direto ou indireto com os alimentos em diferentes pontos da cadeia de produção, ocasionando a contaminação cruzada durante a produção e manuseio de alimentos (MENON, 2016). Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a habilidade de isolados de STEC provenientes de corações e cortes suínos, para formar biofilme em aço inoxidável, em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 37 °C).

2. METODOLOGIA

Foram avaliados 25 isolados de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) provenientes de corações e cortes suínos, previamente caracterizados pelo méto-

do 3M MDS®, baseado na técnica *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification – LAMP*.

A formação do biofilme foi avaliada em cupons de aço inoxidável AISI 304 (rugosidade de 0,366 µm, 10 mm x 10 mm x 1 mm). A cepa padrão ATCC 25922 foi usada como controle positivo. Os isolados de STEC e a cepa controle foram incubados em ágar Triptona de soja (TSA, KASVI) a 37 °C por 24 h. Foi preparada uma suspensão celular em solução salina 0,85%, com concentração celular equivalente a 10⁸ UFC.mL⁻¹ (0,5 da escala de McFarland). O volume de inóculo utilizado dessa suspensão foi de 1 mL. Os tubos de ensaio contendo os cupons de aço inoxidável e o inóculo foram incubados a 4 °C, 25 °C e 37 °C por 24 h. Após esse período, os cupons foram transferidos para novos tubos de ensaio contendo 5 mL de água peptonada 0,1% (AP, ACUMEDIA) e imersos por 1 minuto, em repouso, para remoção de células fracamente aderidas (planctônicas). Em seguida, os cupons foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de AP 0,1% e homogeneizados por 2 min para remoção de células fortemente aderidas (sésseis) (ANDRADE et al., 1998). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas em microtubos contendo 0,9 mL de AP 0,1% e cada diluição foi semeada na superfície de placas de Petri contendo TSA. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Os testes para avaliar o potencial de formação de biofilme em aço inoxidável foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para considerar que um micro-organismo apresenta capacidade de formar biofilme em uma superfície, o valor de 5 log UFC.cm⁻² é utilizado como parâmetro mínimo (RONNER & WONG, 1993; KRONING et al., 2016). Dessa forma, todos os isolados de STEC provenientes de corações e cortes suínos apresentaram habilidade para formar biofilme, pois foram obtidas concentrações de células aderidas aos cupons de aço inoxidável superiores a esse parâmetro, quando incubados a 25 °C e a 37 °C, após 24 h (Figura 1).

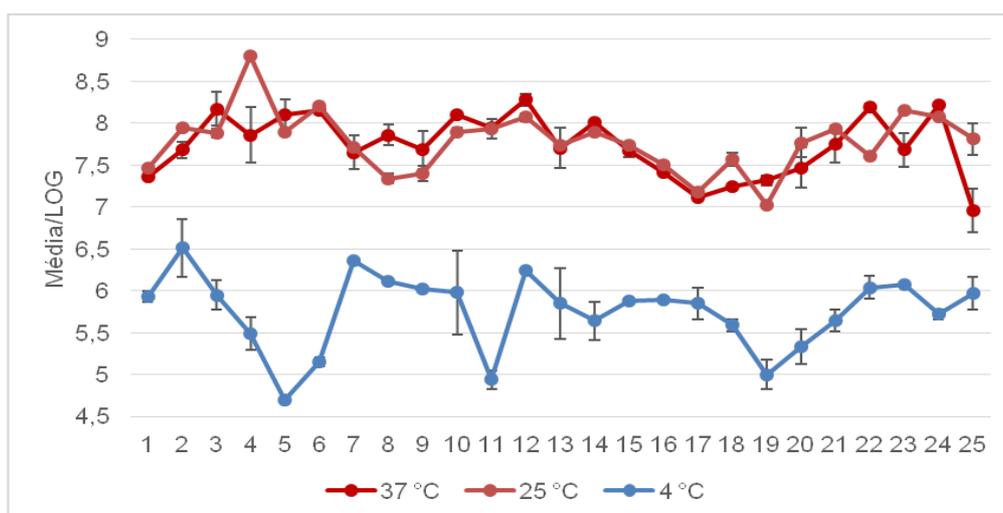


Figura 1. Formação de biofilme em aço inoxidável a 4 °C, 25 °C e 37 °C por isolados de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) provenientes de corações e cortes suínos

As maiores médias de formação de biofilme foram observadas no isolado 4 a 25 °C (8,8 log UFC.cm⁻²) e no isolado 12 a 37 °C (8,2 log UFC.cm⁻²), enquanto as menores médias de formação de biofilme foram observadas para os isolados 5 (4,7 log UFC.cm⁻²) e 11 (4,9 log UFC.cm⁻²), quando incubados a 7 °C (Figura 1).

Sabe-se que a formação do biofilme é influenciada por diferentes fatores, incluindo as características dos isolados e da superfície, disponibilidade de nutrientes, temperatura e outras condições ambientais (RYU et al., 2004). Entretanto, assim como observado neste estudo, outros autores, como BUMUNANG et al. (2020) LAHJAR et al. (2018), MA et al. (2019) e NESSE et al. (2014), também observaram que isolados de STEC apresentavam habilidade de formar biofilme em aço inoxidável. Como exemplo, BUMUNANG et al. (2020) e MA et al. (2019), encontraram contagens bacterianas de 9 log UFC.cm⁻² e 7 log UFC.cm⁻², respectivamente, em isolados de STEC durante ensaios de formação de biofilme em aço inoxidável, após 24 h de incubação a 22 °C.

Em ambientes de processamento, a formação de biofilme por micro-organismos patogênicos, tais como STEC, é preocupante, pois eles podem atuar como fonte potencial de contaminação e afetar a qualidade e a segurança do produto final. A capacidade de formar biofilme em aço inoxidável sugere a possibilidade de contaminação persistente ao longo da cadeia de produção, uma vez que este é o material mais utilizado nos ambientes de processamento e armazenamento de alimentos (VISVALINGAM & HOLLEY, 2013).

4. CONCLUSÕES

Todos os isolados de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) provenientes de corações e cortes suínos formaram biofilme em aço inoxidável, nas diferentes temperaturas testadas (4 °C, 25 °C e 37 °C). A capacidade de formar biofilme em aço inoxidável, uma superfície muito utilizada em indústrias de alimentos, nessa ampla faixa de temperatura, demonstra que esses micro-organismos podem persistir nas plantas de processamento, podendo ser uma fonte constante de contaminação na cadeia de produção de suínos, representando um risco à saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, N.J., BRIDGEMAN, T.A., ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, p.833-838, 1998.
- BOLTON, D.J. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.3, p.357-365, 2011.
- BUMUNANG, E.W., ATEBA, C.N., STANFORD, K., MCALLISTER, T. A., & NIU, Y. D. Biofilm formation by South African non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* on stainless steel coupons. **Canadian journal of microbiology**, v.66, p.328-336, 2020.
- FRAZÃO, N. et al. Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.116, n.36, p.17906-17915, 2019.

- ISLAM, M.A. et al. Prevalence and genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.17, p.5414–5421, 2008.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 123–140, 2004.
- KRONING, I. S., IGLESIAS, M. A., SEHN, C. P., GANDRA, T. K. V., MATA, M. M., SILVA, W.P. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v.58, p.105-111, 2016.
- LAJHAR, S.A., BROWNLIE, J., & BARLOW, R. Characterization of biofilm-forming capacity and resistance to sanitizers of a range of *E. coli* O26 pathotypes from clinical cases and cattle in Australia. **BMC microbiology**, v.18, p.41, 2018.
- MA, Z., BUMUNANG, E.W., STANFORD, K., BIE, X., NIU, Y.D., & MCALLISTER, T. A. Biofilm Formation by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Stainless Steel Coupons as Affected by Temperature and Incubation Time. **Microorganisms**, v.7, p.95, 2019.
- MENG, J. et al. Chapter 12 - Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. (Eds.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th Edition. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2013. p. 287–309.
- MENON, K.V. **Biofilm and food industry**. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, v.3, p.137-142, 2016.
- NESSE, L. L., SEKSE, C., BERG, K., JOHANNESSEN, K.C., SOLHEIM, H., VESTBY, L. K., & URDAHL, A. M. Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. **Appl. Environ. Microbiol.** v.80, p.2042-2049, 2014.
- RONNER, A.B., WONG, A.C.L. Biofilm Development and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on Stainless Steel and Buna-n Rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, p.750-758, 1993.
- RYU, JEE-HOON; KIM, HOIKYUNG; BEUCHAT, LARRY R. Attachment and Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel as Influenced by Exopolysaccharide Production, Nutrient Availability, and Temperature. **Journal of Food Protection**, v.67, p. 2123–2131, 2004.
- VISVALINGAM, J., HOLLEY, R.A. Adherence of cold-adapted *Escherichia coli* O157:H7 to stainless steel and glass surfaces. **Food control**, v.30, p.575-579, 2013.
- XIA, X. et al. Presence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.6, p.1709–1717, 2010.