

POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Escherichia coli* ISOLADA DO ABATE DE BOVINOS EM SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO

PALOMA PEREIRA DE AVILA¹; GIOVANA WINK FALEIRO²; LUIZ GUSTAVO BACH²; CAROLINE KRAUSE BIERHALS²; KIMBERLLY ZIEBELL²; GRACIELA VOLZ LOPES³

¹Universidade Federal de Pelotas – palomaavila92@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – giovanaawink@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lugubach@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolinekbierhals@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kimberllyziebell@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – graciela.volpes@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, que tem formato de bacilo e metabolismo anaeróbio facultativo. É um microrganismo comensal do intestino de humanos e animais de sangue quente, mas algumas estirpes podem causar doenças, como infecções urinárias, diarreia, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e meningite neonatal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Na indústria de alimentos, a capacidade de *E. coli* de formar biofilmes em superfícies como aço inoxidável e poliestireno contribui significativamente para sua persistência no ambiente e dificulta os processos de higienização e desinfecção, estando diretamente associada a surtos de doenças transmitidas por alimentos (BAN-CUCERZAN et al., 2025). Embora o sorotipo O157:H7 seja amplamente reconhecido por seu potencial patogênico, outros sorotipos de *E. coli* também demonstram elevada capacidade de adesão e representam risco de contaminação cruzada em ambientes de processamento de alimentos (MA et al., 2019).

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de formação de biofilme por isolados de *Escherichia coli* provenientes do abate de bovinos em superfície de poliestireno, sob diferentes condições de incubação.

2. METODOLOGIA

Foram incluídos no estudo 45 isolados de *Escherichia coli* provenientes de carcaças e fezes bovinas de abatedouros-frigoríficos da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCTA/FAEM/UFPel). Os isolados foram obtidos em estudo prévio, confirmados geneticamente e fenotipicamente como pertencentes à espécie *E. coli*, e posteriormente, caracterizados quanto aos perfis de virulência e resistência a antimicrobianos (CUNHA, 2023).

O potencial de formação de biofilme foi avaliado em superfície de poliestireno (microplacas de 96 poços) seguindo o protocolo de STEPANOVIĆ et al. (2000; 2007), com adaptações. Os isolados de *E. coli* foram reativados em Caldo TSB (Tryptic Soy Broth) (Merck® - Alemanha) por 24 h a 37 °C. Posteriormente, foram preparados inóculos bacterianos com concentração celular equivalente a 10^8 UFC.mL⁻¹ (0,5 da escala de McFarland) em solução salina estéril (NaCl 0,85%). Uma alíquota de 20 µL de cada suspensão foi pipetada em cada poço teste e acrescida de 200 µL de meio de cultura estéril TSB. Como controle negativo foi

utilizado apenas o meio de cultura. As placas foram incubadas a 25 °C e 37 °C por 48 e 72 h. Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e as cavidades lavadas três vezes com 200 µL de solução salina tamponada para remoção das células planctônicas. As placas foram então secas e coradas com 200 µL de cristal violeta a 0,1% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido por lavagem com água destilada estéril e, após secagem em temperatura ambiente, adicionou-se 200 µL de solução etanol-acetona (80:20, v/v) para solubilização do corante. A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro ($\lambda = 570$ nm) e a classificação seguiu STEPANOVIĆ et al. (2000): não formadores ($DO \leq OD_c$), fracos ($OD_c < DO \leq 2 \times OD_c$), moderados ($2 \times OD_c < DO \leq 4 \times OD_c$) e fortes ($DO > 4 \times OD_c$), sendo OD_c definido como a média dos controles negativos mais três vezes o desvio-padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 45 isolados de *E. coli* avaliados em superfície de poliestireno, 95,6% (43/45) apresentaram capacidade de formação de biofilme a 37 °C quando incubados por 48 h. Dentre eles, 14 (31,1%) foram classificados como fortes formadores de biofilme ($DO = 1,423 \pm 0,172$), 10 (22,2%) como moderados ($DO = 0,492 \pm 0,083$), e 19 (42,2%) como fracos, enquanto apenas 2 isolados (4,4%) não apresentaram formação de biofilme. A média de DO foi de 0,696, com ampla variação entre isolados (0,199 a 2,744). Após 72 h a 37 °C, 94,3% (33/35) dos isolados mantiveram formação de biofilme, embora com redução da DO média ($0,357 \pm 0,382$). Na avaliação a 25 °C por 48 h, 70% (7/10) dos isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme. Todos os isolados formadores de biofilme foram classificados como moderados a fortes, com DO média de 1,323 ± 0,943. Embora a temperatura ambiente seja menos favorável que 37 °C, alguns dos isolados mantiveram elevada capacidade de adesão, o que reforça a plasticidade adaptativa de *E. coli* frente a diferentes condições ambientais (GEURTSEN et al., 2022).

A temperatura é um fator determinante na formação de biofilmes por *Escherichia coli*, influenciando diretamente a adesão celular, a produção de matriz extracelular e a resistência a agentes sanitizantes. Neste estudo, foi realizada uma comparação entre as condições de incubação a 25 °C e 37 °C, com o objetivo de avaliar o comportamento dos isolados quanto à capacidade de formação de biofilme em superfície de poliestireno. A 37 °C foi observado que 95,6% dos isolados de *E. coli* apresentaram capacidade de formação de biofilme e 31,1% dos isolados foram classificados como fortes formadores de biofilme quando incubados por 48 h. Segundo TRANG et al. (2023), 17% dos isolados de *E. coli* de uma indústria processadora de pescados foram classificados como fortes formadores de biofilme em poliestireno a 37 °C. MADANI et al. (2022) avaliaram isolados de *E. coli* provenientes de leite e produtos lácteos e observaram 68,42% dos isolados com habilidade de formar biofilme em poliestireno a 30 °C, sendo 28,9% classificados como fortes formadores de biofilme. Quando os isolados foram testados a 25 °C, 70% apresentaram capacidade de formação de biofilme e todos os isolados foram classificados como moderados ou fortes formadores de biofilme. Essa temperatura, próxima à ambiente, simula condições comuns em áreas de processamento de alimentos, como salas de corte e embalagens, onde a persistência bacteriana representa um risco significativo à segurança dos alimentos. STANFORD et al. (2021) encontraram 42,9% dos isolados de *E. coli* provenientes de equipamentos

do abate de bovinos capazes de formar biofilmes em poliestireno a 15 °C, sendo 70% classificados como fortes formadores. No extremo oposto, 73% dos isolados de carne bovina não formaram biofilmes. Dentre os isolados de *E. coli* de carcaças bovinas e couro bovino, 53% e 44,6% foram formadores de biofilmes, respectivamente. Comparando as fontes, os autores encontraram maior capacidade de formação de biofilme em isolados de *E. coli* de equipamentos de processamento em comparação com outros isolados avaliados. Até o momento, são escassos os estudos que comparam a capacidade de formação de biofilme por isolados de *E. coli* da cadeia de produção da carne bovina. Os resultados obtidos neste estudo destacam a importância de considerar a temperatura ambiental como variável crítica no controle microbiológico em ambientes industriais, garantindo maior eficácia na prevenção da contaminação cruzada e na segurança dos alimentos.

Tabela 1. Potencial de formação de biofilme em poliestireno por isolados de *Escherichia coli* provenientes do abate de bovinos

Condições de incubação	Total de isolados testados	No. de isolados formadores de biofilme (%)	No. de isolados não formadores de biofilme (%)
37 °C por 48 h	45	43 (95,6%)	2 (4,4%)
37 °C por 72 h	35	33 (94,3%)	2 (5,7%)
25 °C por 48 h	10	7 (70,0%)	3 (30,0%)

A classificação em “formadores” e “não formadores” foi definida a partir dos valores de densidade óptica (DO) obtidos no ensaio de cristal violeta, conforme os *thresholds* descritos na metodologia.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *E. coli* apresentaram elevado potencial de formação de biofilmes em poliestireno a 37° C e 25 °C. A identificação de isolados de *E. coli* classificados como fortes e moderados formadores de biofilme reforça o risco de contaminação cruzada e a necessidade de estratégias de higienização adaptadas ao ambiente de abate de bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAN-CUCERZAN, A.; IMRE, K.; MORAR, A.; MARCU, A.; HOTEA, I.; POPA, S.-A.; PĂTRÎNJAN, R.-T.; BUCUR, I.-M.; GAŞPAR, C.; PLOTUNA, A.-M.; BAN, S.-C. Persistent Threats: A Comprehensive Review of Biofilm Formation, Control, and Economic Implications in Food Processing Environments. **Microorganisms**, v. 13, n. 8, p. 1805, 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/13/8/1805>.

CUNHA, F. S. da. **Perfil de resistência e virulência de isolados de *Escherichia coli* da cadeia de abate bovino**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

GEURTSEN, J. M.; WEERDENBURG, E.; ZOMER, A.; MCNALLY, A.; POOLMAN, J. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. FEMS **Microbiology Reviews**, v. 46, n. 6, p. fuac031, 2022. Disponível em: <https://PMC9629502/>.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818#citeas>.

MADANI A.; ESFANDIARI Z.; SHOAEI P.; ATAEI B. Evaluation of Virulence Factors, Antibiotic Resistance, and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Isolated from Milk and Dairy Products in Isfahan, Iran. **Foods**. 2022 Mar 26;11(7):960. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/7/960>.

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, n. 4, p. 95, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/4/95>.

STANFORD K.; TRAN F.; ZHANG P.; YANG X. Biofilm-Forming Capacity of *Escherichia coli* Isolated from Cattle and Beef Packing Plants: Relation to Virulence Attributes, Stage of Processing, Antimicrobial Interventions, and Heat Tolerance. **Appl Environ Microbiol.** 2021 Nov 10;87(23):e0112621. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34550756/>.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLJA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

TRANG PN.; ANH NGOC TT.; MASUDA Y.; HOHJOH KI.; MIYAMOTO T. Antimicrobial resistance and biofilm formation of *Escherichia coli* in a Vietnamese Pangasius fish processing facility. **Heliyon**. 2023 Oct 10;9(10):e20727. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37867806/>.