

## CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE PESCADO SALGADO

FLÁVIA LIÉGE SCHÜTZ VOLOSKI<sup>1</sup>; JULIA ROSIN DA SILVA<sup>2</sup>; MARCELLE GARCIA<sup>1</sup>; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS CONCEIÇÃO<sup>3</sup>; EDUARDA HALLAL DUVAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos/DCTA/UFPel  
[fla\\_voloski@hotmail.com](mailto:fla_voloski@hotmail.com) ; [marcelle\\_garcia@hotmail.com](mailto:marcelle_garcia@hotmail.com)

<sup>2</sup>Graduação em Medicina Veterinária/UFPel - [julia\\_rosin@hotmail.com](mailto:julia_rosin@hotmail.com)

<sup>3</sup>Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal / Universidade Federal de Pelotas – [ritinhaconceicao@hotmail.com](mailto:ritinhaconceicao@hotmail.com); [eduardahd@hotmail.com](mailto:eduardahd@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A presença de substratos orgânicos e inorgânicos em superfícies de processamento de alimentos favorece a aderência e multiplicação de micro-organismos, possibilitando a formação de biofilmes e, consequentemente, uma maior dificuldade de ação dos sanitizantes na remoção bacteriana (BERNARDES et al., 2012).

Os biofilmes podem ser definidos como complexos conglomerados de células, estruturados sobre inúmeros tipos de superfícies favoráveis à sua formação (DONLAN; COSTERTON, 2002). Uma vez formados, os biofilmes atuam como pontos de contaminação constante em superfícies de produção de alimentos devido ao desprendimento de células de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes. Isso resulta no comprometimento da segurança microbiológica das matérias-primas, bem como dos produtos finais, diminuindo a vida de prateleira dos produtos alimentícios e colocando a saúde do consumidor em risco (FUSTER-VALLS et al., 2008).

*Staphylococcus aureus* é um patógeno humano oportunista, considerado um problema para a indústria de alimentos, pois além do frequente envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, esse micro-organismo também é capaz de se aderir em diferentes superfícies, formando biofilmes (SHALE et al., 2005; RODE et al., 2007; DI CICCIO et al., 2015). Esta capacidade é um importante fator de virulência de *S. aureus*, já que possibilita a sua persistência no ambiente de processamento, tornado-se uma constante fonte de contaminação de alimentos (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014).

A higiene na indústria de alimentos é um fator de extrema importância para a qualidade final dos produtos, pois falhas nos processos de higienização podem favorecer o acúmulo de resíduos orgânicos e inorgânicos nas superfícies de equipamentos e utensílios da linha de produção, de modo a se tornarem potenciais focos de contaminação cruzada (OLIVEIRA et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme por cepas de *S. aureus* isoladas de pescado salgado, tendo em vista a importância desse fator de virulência em relação à qualidade dos alimentos e aos riscos à saúde dos consumidores.

### 2. METODOLOGIA

Inicialmente, 23 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pescado salgado, já confirmadas fenotípica e genotipicamente, foram semeadas em caldo TSB e incubadas a 37°C/24 horas. O ensaio de formação de biofilme foi realizado

segundo o protocolo recomendado por STEENACKERS et al. (2011), com algumas modificações. Foram distribuídos uniformemente em uma placa de 96 cavidades, 200 $\mu$ L de caldo TSB. Após, os cultivos bacterianos com densidade óptica já ajustada (600 nm) foram diluídos (1:25) e semeados (8 $\mu$ L) em cada cavidade da placa, a qual recebeu uma tampa onde o biofilme deve ser formado, no caso de produção. As placas foram incubadas a 37°C/48 horas. Transcorrido este período, as tampas das placas foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (Phosfat e Buffered Saline – PBS) e coradas com cristal violeta (isopropanol, metanol e PBS, v/v: 1:1:18) por 30 minutos. Após, foram lavadas com água destilada estéril, secas a temperatura ambiente por 30 minutos e colocadas em ácido acético a 30%, sendo esta última etapa realizada para que o biofilme formado na tampa se solte e fique no meio. Removidas as tampas, foi realizada a leitura da densidade óptica, em um espectrofotômetro, utilizando comprimentos de onda de 600 nm e 570 nm. Caldo TSB estéril foi utilizado como controle negativo (C-) e uma cepa de *Staphylococcus coagulase* positiva fortemente formadora de biofilme, já conhecida, foi utilizada como controle positivo (C+). Os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras. As cepas foram classificadas segundo a aderência na tampa da placa e divididas em quatro categorias, conforme o estipulado por STEPANOVIC et al. (2000).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliando a capacidade de formação de biofilme por cepas de *S. aureus* isoladas de pescado salgado, pode-se observar que 62,2% (15/23) das cepas foram classificadas como fracamente formadoras de biofilme, enquanto 21,7% (5/23) e 8,7% (2/23) caracterizaram-se como moderadamente e fortemente formadoras de biofilme, respectivamente.

Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al. (2014), que verificaram capacidade de formação de biofilme em 100% (26/26) das cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes produtos de pesca na Espanha. Apesar disso, estes autores observaram que 80% (8/10) das cepas com maior capacidade de formação de biofilme foram isoladas de produtos de pesca altamente processados (como pescados salgados), demonstrando uma pressão seletiva das condições de processamento sobre *S. aureus*. No estudo de RODE et al. (2007), verificou-se que a concentração de sal exerce influência sobre a capacidade de formação de biofilme por cepas de *S. aureus*, já que vários padrões de biofilme foram obtidos quando o patógeno foi exposto a diferentes concentrações de sal.

Sendo *S. aureus* o principal componente da microbiota humana na pele, a produção de alimentos altamente processados, que envolve intensa manipulação e contato com superfícies, pode facilitar a disseminação deste patógeno no ambiente de processamento (SIMON; SANJEEV, 2007), possibilitando a formação de biofilmes que aumentam a sua resistência a fatores externos, como os teores elevados de sal (DONLAN; COSTERTON, 2002; VAN-HOUDT; MICHELS, 2010). Segundo RODE et al. (2007), este micro-organismo é pouco competitivo e apresenta maior risco em alimentos cuja microbiota natural já foi destruída ou inibida, como em alimentos salgados.

Estes resultados demonstram a importância da adoção de boas práticas de higiene, além da correta limpeza e sanitização de equipamentos e superfícies de processamento, a fim de evitar condições sob as quais *S. aureus* seja capaz de

sobreviver, se multiplicar e, consequentemente, formar biofilme em indústrias de alimentos.

#### 4. CONCLUSÕES

Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas no presente estudo apresentam capacidade de formação de biofilme, mesmo que a maioria delas fracamente. Isso implica na capacidade de manutenção deste micro-organismo dentro da indústria, tornando-se uma fonte de contaminação dos alimentos. Deste modo, mostra-se indispensável a necessidade de melhorias nas práticas de sanitização na indústria, a fim de evitar a multiplicação microbiana com consequente adesão e formação de biofilmes, garantindo a saúde do consumidor.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDES, P. C. ; ARAUJO, E. A. ; PIRES, A. C. S. ; FIALHO JUNIOR, J. F. Q. ; LELIS, C. A. ; ANDRADE, N. J. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 1261-1268, 2012.
- DI CICCIO, P.;VERGARA, A.; FESTINOB, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDIA, E.; GHIDINIA, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**. v. 50, p. 930-936, 2015.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- FUSTER-VALLS, N. et al. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**. v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.
- OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.41, p.97-106, 2010.
- RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress condition. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, p. 372-383, 2007.
- SHALE, K.; LUES, J. F. R.; VENTER, P.; BUYS, E. M. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**. v. 22, p. 433-438, 2005.
- SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish-processing factory workers. **Food Control**. v. 18, p.1565-1568,2007.
- STEENACKERS, H.P.L.; ERMOLATEV, D.S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; DE COSTER, D.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E.V.; DE VOS, D.E.;

VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Structure-activity relationship of 2-hydroxy-2-aryl-2,3-dihydroimidazo [1,2-a]pyrimidinium salts and 2N-substituted 4(5)-aryl-2-amino-1H-imidazoles as inhibitors of biofilm formation by *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p.3462-3473, 2011.

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

VAN-HOUT, R.; MICHELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**. v. 109, p.1117-1131, 2010.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; RODRÍGUEZHERRERA, J.J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**.v. 39, p. 8-16, 2014.