

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA PROVENIENTES DE SUSHIS DA CIDADE DE PELOTAS, RS

KAUANA DOS SANTOS SOARES¹; ISABELA SCHNEID KRONING²; TASSIANA RAMIRES²; GABRIELA PEIL DA SILVA²; GUSTAVO AFRA MAZZA²; VLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – kauana_soares@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – isabelaschneid@gmail.com; tassianaramires@gmail.com;
gabriela.peil19@gmail.com; gugamazza@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento na demanda de produtos prontos para o consumo, associado à quebra de preconceitos frente à ingestão de alimentos da cultura japonesa, como o sushi e o sashimi, os brasileiros vêm empregando esses alimentos cada vez mais nas suas refeições (SAMPAIO, 2009). Entretanto, com o excesso de manipulação durante o preparo do sushi, adicionado ao fato de serem consumidos sem tratamento térmico prévio, esses alimentos acabam por ser potenciais carreadores de micro-organismos patogênicos (LIANG et al., 2016), entre eles Estafilococos coagulase positiva (ECP) (MENEZES et al., 2006).

Staphylococcus spp. podem ser divididos em dois grupos, a partir de sua capacidade de produzir a enzima coagulase, podendo ser classificados como coagulase positiva ou negativa. Dentre as espécies coagulase positiva existem três principais de interesse em alimentos: *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. Porém, *S. lutrae*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. delphini* também são coagulase positiva, mas sem importância na segurança dos alimentos. Os Estafilococos coagulase negativa (ECN), incluem todas as demais espécies de *Staphylococcus* (GOMES, 2013).

As intoxicações por ECP são causadas pela ingestão de enterotoxinas produzidas e excretadas por esses micro-organismos durante a sua multiplicação nos alimentos, principalmente naqueles de origem animal. As intoxicações alimentares estafilocócicas são importantes causas de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em todo o mundo. As DTA são responsáveis por um número considerável de internações em diversos países, porém, no Brasil os casos são subdiagnosticados e subnotificados (PEREIRA et al., 1994; COSTALUNGA; TONDO, 2010; SANTANA et al., 2010).

Além da produção dessas enterotoxinas, ECP apresentam capacidade de produzir biofilme, que se caracteriza pela formação de uma placa bacteriana, a qual pode ser constituída por uma ou mais bactérias. O biofilme facilita a sobrevivência dessas bactérias em ambientes hostis, como aqueles encontrados em ambientes de processamento de alimentos, possibilitando uma contaminação cruzada durante a manipulação dos alimentos (FERREIRA; DOMINGUES, 2016; MENON, 2016). Os biofilmes podem ser formados em várias superfícies, as quais podem apresentar contato direto ou indireto com os alimentos, sendo assim, são considerados uma das principais fontes de contaminação na indústria alimentícia (YANG et al., 2016).

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme em aço inox por isolados de ECP provenientes de sushis comercializados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. METODOLOGIA

A formação de biofilme foi avaliada em oito isolados, provenientes de sushis, previamente caracterizados como ECP. A formação de biofilme foi avaliada em cupons de aço inoxidável AISI 304 (0,366 µm rugosidade, 10 mm x 10 mm x 1 mm). Os oito isolados de ECP e a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 foram cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia®) durante 24 horas, a 37 °C. Após esse período, os isolados foram diluídos em solução salina 0,85% até a turbidez 0,5 na escala de McFarland ($\sim 10^8$ UFC.mL⁻¹) e retirou-se 1 mL diretamente da solução salina padronizada na escala 0,5 de McFarland.

Os tubos de ensaio foram incubados a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, os cupons foram transferidos para novos tubos de ensaio contendo 5 mL de água Peptonada 0,1% (AP, Oxoid®), e ficaram imersos por 1 minuto em repouso, para retirada das células planctônicas. Em seguida, os cupons foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de AP 0,1%, e submetidos a agitação em vortex, por 2 minutos, para retirada das células sésseis (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 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 ágar TSA. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. O teste foi realizado em triplicata. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), empregando o teste de Fisher ($p<0,05$), utilizando o programa STATISTIX versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que os oito isolados de ECP, provenientes de sushis, apresentam potencial de formação de biofilme.

Tabela 1 - Contagens Celulares (UFC.cm⁻²) de Isolados de Estafilocos Coagulase Positiva (ECP) Provenientes de Sushis em Superfície de Aço Inox Incubados a 37 °C por 24 h

Isolado	Contagens (log UFC.cm ⁻²)	Média Contagens (log UFC.cm ⁻²)
ECP 2	5,54	5,09 ^{AB}
	4,64	
ECP 7	7,33	6,52 ^{AB}
	5,70	
ECP 10	5,95	5,37 ^{AB}
	4,79	
ECP 25	7,32	6,66 ^{AB}
	6,00	
ECP 27	6,64	6,09 ^{AB}
	5,53	
ECP 30	7,54	6,85 ^A
	6,16	
ECP 32	6,77	6,16 ^{AB}
	5,54	
ECP 34	5,02	4,86 ^B
	4,71	

Segundo WIRTANEN et al. (1996), considera-se que em concentrações celulares superiores a 10^3 UFC.g⁻¹ há formação de biofilme bacteriano. Assim, todos os oito isolados avaliados foram considerados como formadores de biofilme, pois apresentaram contagens superiores a 10^4 UFC.g⁻¹. Sabendo-se que nas plantas de processamento de alimentos o aço inox é um material bastante utilizado, esses resultados nos indicam que esses isolados apresentam capacidade de promover uma contaminação persistente nesses locais. Resultados semelhantes foram obtidos por BOARI et al. (2009), que observaram formação de biofilme por *S. aureus*, provenientes de leite, em aço inoxidável.

A avaliação da formação de biofilme bacteriano nas indústrias de alimentos é um foco muito importante de pesquisa, pois este proporciona a elevação da carga microbiana no ambiente industrial, além de poder ser uma fonte constante de contaminação por patógenos nos alimentos, ocasionando riscos à saúde do consumidor. Além disso, podem acelerar o processo de deterioração dos alimentos, diminuindo a sua vida útil (FLACH, 2005).

Todos os isolados avaliados apresentaram habilidade de formar biofilme, sendo que a contagem celular não diferiu significativamente em seis isolados. Entretanto, dois isolados apresentaram contagens distintas dos demais: o isolado ECP 30 apresentou a maior capacidade de formar biofilme, enquanto o isolado ECP 34 apresentou a menor capacidade. Essa diferença pode dever-se a uma maior adaptação desses isolados aos ambientes aos quais foram expostos (MATHUR; SHING, 2005). Além disso, os isolados podem apresentar padrões distintos de expressão de genes relacionados à formação de biofilme (KRONING, 2015).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os obtidos por FROZI et al. (2017), que avaliaram a capacidade de formação de biofilme por isolados de *S. aureus* provenientes de plantas de processamento de pescados, obtendo contagens superiores a 10^4 UFC.g⁻¹, além de descreverem a variação nas contagens entre isolados.

4. CONCLUSÕES

Com o presente estudo, pode-se confirmar o potencial de formação de biofilme por isolados de ECP provenientes de sushis comercializados na cidade de Pelotas, RS, o que pode representar um perigo à saúde dos consumidores, pois estes micro-organismos podem se tornar endêmicos no ambiente de preparo destes produtos.

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, n.7, p.833-838, 1998.
- BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme e em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.29, n.4, p886-895, 2009.
- COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

- FERREIRA, S.; DOMINGUES, F. The antimicrobial action of resveratrol against *Listeria monocytogenes* in food-based models and its antibiofilm properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2016.
- FLACH, J.; KARNOOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.3, p.291-296, 2005.
- FROZI, J. B.; ESPER, L. M. R.; FRANCO, R. M. Single- and Multispecies Biofilms by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. Isolated from Raw Fish and a Fish Processing Unit. **Ciência Rural**, v. 47, n.10, 2017.
- GOMES, M. J. P. **Gênero Staphylococcus spp.** UFRGS, Porto Alegre, 2013. Acessado em 30 set. 2017. Online. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%A3Anero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>
- KRONING, I. S. ***Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite em diferentes regiões do Rio Grande do Sul: enterotoxigenicidade, capacidade de formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e classificação nos grupos agr.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas
- LIANG, W. L.; PAN, Y. L.; CHENG, H. L.; LI, T. C.; YU, P. H. F.; CHAN, S. W. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. **Food Control**, v. 60, p. 45-50, 2016.
- MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.281-295, 2005.
- MENEZES, F.G.R.; SILVA, C.M.; CARVALHO, F.C.T.; SOUSA, D.B.R; VIEIRA, R.H.S.F. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em sushis e sashimis comercializados na cidade de Fortaleza, Ceará. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE DO PESCADO**, 2., São Vicente, 2006, **Anais...** São Vicente: Simpósio de Controle do Pescado, v.2, p.402, 2006.
- MENON, K.V. Biofilm and food industry. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, Estados Unidos da América, v.3, n.4, p.137-142, 2016.
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning from creamfilled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.28, n.6, p.406-409, 1994.
- SAMPAIO, J.A.C. **Comportamento do consumidor de comida japonesa: um estudo sobre atributo e valores.** 2009. Dissertação (Mestrado em Administração e Controladoria) – Curso de Mestrado Profissional de Administração e Controladoria, Universidade Federal do Ceará.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.
- WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial Evaluation of the Biotransfer Potential from Surfaces with *Bacillus* Biofilms after Rinsing and Cleaning Procedures in Closed Food-Processing Systems. **Journal of Food Protection**, Estados Unidos da América, v.59, n.7, p.727-733, 1996.
- YANG, Y.; WIKIEŁ, A.J.; DALL'AGNOL, L.T.; ELOY, P.; GENET, M.J.; MOURA, J.J.G.; SAND, W.; DUPONTGILLAIN, C.C.; ROUXHET, P.G. Proteins dominate in the surface layers formed on materials exposed to extracellular polymeric substances from bacterial cultures. **Biofouling**, v.32, n.1, p.95–108, 2016.