

## POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* O157:H7 PROVENIENTE DE SUSHI

TASSIANA RAMIRES<sup>1</sup>; NATALIE RAUBER KLEINUBING<sup>2</sup>; ISABELA SCHNEID  
KRONING<sup>2</sup>; LAÍS ABREU ANASTÁCIO<sup>2</sup>; HELENA REISSIG SOARES VITOLA<sup>2</sup>;  
WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – natalierk10@hotmail.com; isabelaschneid@gmail.com;  
laisabr@gmail.com; helena\_rsv@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O sushi é um prato japonês, feito com arroz moldado, em formato alongado ou de rolos, contendo peixe, frutos do mar ou outros ingredientes colocados por cima (KULAWIK et al., 2019). Nas últimas décadas, esse prato ganhou popularidade entre os consumidores de todo o mundo (SAKAMOTO & ALLEN, 2011). Devido ao fato do sushi ser um produto altamente perecível, apresenta um curto prazo de validade, geralmente não superior a 3-5 dias, devido à alta deterioração microbiana (HOEL et al., 2015).

Coliformes, especialmente *Escherichia coli*, são micro-organismos indicadores em produtos alimentícios, uma vez que altas contagens de coliformes, e a presença de *E. coli*, geralmente refletem um manuseio higiênico inadequado durante o processo de produção e condições inadequadas de armazenamento (SOUSA et al., 2002; GONZALEZ et al., 2003; ATANASSOVA et al., 2008). Entre os patótipos de *E. coli*, o sorotipo O157:H7 recebe destaque pois pode causar doenças graves, mesmo quando um baixo número de células bacterianas estiver presente nos alimentos (ARMSTRONG et al., 1996).

Um importante mecanismo de sobrevivência de micro-organismos patogênicos em ambientes hostis é a capacidade de formar biofilme. Os biofilmes podem ser encontrados em ambientes de processamento de alimentos, promovendo a contaminação cruzada durante a produção e o manuseio dos alimentos (MENON, 2016). Eles podem ser formados em várias superfícies, as quais podem apresentar contato direto ou indireto com os alimentos e, portanto, são considerados uma importante fonte de contaminação na indústria de alimentos (YANG et al., 2016). Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de formação de biofilme em aço inoxidável de um isolado de *E. coli* O157:H7 proveniente de sushi.

### 2. METODOLOGIA

A formação do biofilme foi avaliada usando cupons de aço inoxidável AISI 304 (rugosidade de 0,366 µm, 10 mm x 10 mm x 1 mm). A cepa padrão NCTC 12900 (*E. coli* O157:H7) foi usada como controle positivo. O isolado de *E. coli* O157:H7 e a cepa controle foram incubados em ágar Triptona de soja (TSA) por 24 h, a 37 °C. Foi preparada uma suspensão celular, com solução salina 0,85%, com concentração celular equivalente a 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (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 7 °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 (AP) 0,1% e

imersos por 1 minuto, em repouso, para remoção de células fracamente aderidas. 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 sésseis (ANDRADE et al., 1998). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas, em microtubos contendo 0,9 mL de 0,1% AP, e cada diluição foi semeada na superfície de placas de Petri contendo TSA. As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C. Os testes para avaliar o potencial de formação de biofilme em aço inoxidável foram realizados em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para considerar que um micro-organismo apresente capacidade de formar biofilme em uma superfície, o valor mínimo de 5 log UFC.cm<sup>-2</sup> é utilizado como parâmetro (RONNER & WONG, 1993; KRONING et al., 2016). Dessa forma, o isolado de *E. coli* O157:H7 proveniente de sushi, assim como a cepa padrão (NCTC 12900), apresentaram a capacidade de formar biofilme, pois foram obtidas concentrações de células aderidas ao cupom de aço inoxidável superiores a 5 log UFC.cm<sup>-2</sup>, em todas as temperaturas testadas neste estudo. Tanto o isolado de *E. coli* O157:H7, quanto a cepa padrão, apresentaram capacidade de formar biofilme em superfícies de aço inoxidável a 7 °C, 25 °C e 37 °C, após 24 h de incubação. As maiores médias de formação de biofilme foram observadas a 25 e 37 °C (7,1 log UFC.cm<sup>-2</sup>), enquanto as menores médias de formação de biofilme foram observadas para a cepa padrão, quando incubada a 7 °C (Tabela 1).

Tabela 1. Formação de biofilme por um isolado de *Escherichia coli* O157:H7 proveniente de sushi e pela cepa padrão (NCTC 12900) em aço inoxidável nas temperaturas de 7, 25 e 37 °C

Temperatura	Cepa Padrão	Isolado <i>E. coli</i> O157:H7
7 °C	5.1 <sup>Aa</sup>	5.8 <sup>Aa</sup>
25 °C	6.3 <sup>Aa</sup>	7.1 <sup>Bb</sup>
37 °C	6.5 <sup>Aa</sup>	7.1 <sup>Bb</sup>

Letras maiúsculas comparam valores de coluna e letras minúsculas comparam valores de linha

A análise estatística revelou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na capacidade de formação de biofilme entre a cepa padrão e o isolado de *E. coli* O157:H7 a 25 °C e 37 °C, mas não a 7 °C. Com relação às diferentes temperaturas testadas, a 7 °C, o isolado de *E. coli* O157:H7 apresentou diferença significativa em relação às demais temperaturas, o que não foi observado para a cepa padrão. O isolado de *E. coli* O157:H7 apresentou contagens de 5,8 log CFU.cm<sup>-2</sup> a 7 °C, que diferiram significativamente das contagens a 25 °C e 37 °C (ambas com 7,1 log CFU.cm<sup>-2</sup>). Por outro lado, as contagens da cepa padrão não diferiram significativamente entre as diferentes temperaturas de incubação utilizadas.

FROZI et al. (2017), encontraram contagens bacterianas durante ensaios de formação de biofilme em aço inoxidável de  $7 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$  após 24 h de incubação a 25 °C, usando isolados de *E. coli*, não pertencentes ao sorotipo O157, provenientes de peixes crus e de uma unidade de processamento de peixes. Esse resultado vai ao encontro do obtido neste estudo, quando consideradas as temperaturas de 25 °C e 37 °C.

A formação de biofilme por micro-organismos patogênicos em ambientes de processamento de alimentos é preocupante, pois eles podem atuar como fonte potencial de contaminação e afetar a qualidade e a segurança do produto final. Em alimentos como sushi, os quais são consumidos sem nenhum tratamento térmico adicional, pode ser considerado um problema de saúde pública. Assim como observado neste estudo, outros autores (DEWANTI & WONG, 1995; RYU & BEUCHAT, 2004; DOUROU et al., 2011; VOGEELEER et al., 2016) também verificaram a habilidade de *E. coli* O157:H7 de formar biofilme em aço inoxidável. A capacidade de formar biofilme em aço inoxidável sugere a possibilidade de contaminação persistente ao longo do processo de produção do sushi, uma vez que este é o material mais utilizado nos ambientes de processamento e armazenamento de alimentos (VISVALINGAM & HOLLEY, 2013).

#### 4. CONCLUSÕES

A capacidade de formar biofilme apresentada pelo isolado de *E. coli* O157:H7 pode desencadear uma fonte constante de contaminação na linha de produção de sushis, podendo representar um risco à saúde do consumidor.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, G.L., HOLLINGSWORTH, J., MORRIS, J.G.JR. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, v.18, p.29-51, 1996.
- 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.
- ATANASSOVA, V., REICH, F., KLEIN, G. Microbiological Quality of Sushi from Sushi Bars and Retailers. **Journal of Food Protection**, v.71, p.860–864, 2008.
- DEWANTI, R., AND A. C. L. WONG. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.147–164, 1995.
- DOUROU, D., BEAUCHAMP, C.S., YOON, Y., GEORNARAS, I., BELK, K.E., SMITH, G.C., NYCHAS, G.J.E., SOFOS, J.N. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.262–268, 2011.
- 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, 2017.

- GONZALEZ, R.D., TAMAGNINI, L.M., OLMOS, P.D., DE SOUSA, G.B. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. **Food Microbiology**, v.20, p.601–604, 2003.
- HOEL, S., MEHLI, L., BRUHEIM, T., VADSTEIN, O., JAKOBSEN, A.N. Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway. **Journal of Food Protection**, v.78, n.5, p.977-982, 2015.
- 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.
- KULAWIK, P. JAMRÓZ, E., ZAJĄC, M., GUZIK, P., TKACZEWSKA, J. The effect of furcellaran-gelatin edible coatings with green and pu-erh tea extracts on the microbiological, physicochemical and sensory changes of salmon sushi stored at 4 °C **Food Control**, v.100, p.83-91, 2019.
- MENON, K.V. Biofilm and food industry. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.**, v.3, p.137-142, 2016.
- 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, J.-H., KIM, H., BEUCHAT, L. 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.
- SAKAMOTO, R., ALLEN, M. There's something fishy about that sushi: How Japan interprets the global sushi boom. **Japan Forum**, v.23, n.1, p.99-121, 2011.
- SOUSA, G.B., TAMAGNINI, L.M., OLMOS, P.D., GONZALEZ, R.D. Microbial enumeration in ready-to-eat foods and their relationship to good manufacturing practice. **Journal of Food Safety**, v.22, p.27-38, 2002.
- 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.
- VOGELEER, P., TREMBLAY, Y.T.N., JUBELIN, G., JACQUES, M., HARELA, J. Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. **Applied and Environmental Microbiology**, v.82, p.1448-1458, 2016.
- 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, p.95-108, 2016.