

Formação de biofilmes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 em superfície de aço inoxidável e eficácia de sanitizante

Biofilm formation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 and O111:H8 on the stainless steel surface and the effectiveness of sanitizer

RIALA6/1646

Paulo Gomes de LIMA^{1*}, Julia do Prado Lima Guimarães CABRAL², Thalita Martins da SILVA², Luciana Maria Ramires ESPER², Alice Gonçalves Martins GONZALEZ², Robson Maia FRANCO¹

*Endereço para correspondência: ¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Niterói, RJ, Brasil, CEP: 24230-000. Tel: 21 3674-7333. E-mail: pglima@id.uff.br

²Departamento de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, UFF, Niterói, RJ, Brasil

Recebido: 07.11.2014 - Aceito para publicação: 14.05.2015

RESUMO

Neste estudo as cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) O153:H25, O113:H21 e O111:H8, isoladas de rebanhos do país, foram avaliadas quanto à capacidade de formar biofilmes em superfície de aço inoxidável utilizada na indústria de alimentos, bem como a eficácia de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na inativação desses biofilmes. A capacidade de formação de biofilme foi detectada em todas as cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga. Na avaliação da eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio, nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹, observou-se a redução a <1 log UFC/cm² em todas as cepas e nos tempos avaliados. Estes dados reforçam a importância do correto procedimento de higienização, uma vez que biofilmes podem tornar-se importantes fontes de contaminação no ambiente de produção de alimentos.

Palavras-chave. STEC não-O157, biofilmes, toxina shiga, aço inoxidável.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the biofilm formation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 and O111:H8 (STEC non-O157), isolated from Brazilian cattle, on the stainless steel surface, and also the efficacy of different concentrations of sodium hypochlorite for inactivating these biofilms. The ability to form biofilm was demonstrated in all of Shiga toxin-producing *E. coli* strains. In assessing the effectiveness of sodium hypochlorite sanitizer, a reduction to <1 log CFU/cm² was observed in all of the evaluated strains and times. These data strengthen the relevance of the correct cleaning procedure, considering that biofilms formations might be an important source of food contamination.

Keywords. STEC non-O157, biofilms, Shiga toxin-producer, stainless steel.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli produtoras de toxina Shiga (STEC) causam, em humanos, diarreia que pode evoluir para colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica-urêmica (SHU). Surtos epidêmicos ou casos esporádicos graves são causados principalmente pelos sorotipos O157:H7, O157:H-, O26:H11, O111:H8, O111:H-, O103:H2, O113:H21 e O145:H⁻¹⁻⁴.

Animais domésticos e selvagens, principalmente ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos, são considerados os principais reservatórios de STEC⁵. A maioria dos estudos sobre a ocorrência de STEC em alimentos relaciona-se com surtos relacionados a carnes, entretanto leite não pasteurizado, água e produtos frescos tem sido relacionados⁶.

Tem-se observado que vários sorotipos de STEC têm a capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em grandes variedades de superfícies de contato, de materiais usados nas plantas de processamento de alimentos⁷. Biofilmes formados por micro-organismos patogênicos têm sido considerados de grande importância no contexto de segurança alimentar despertando o interesse de inúmeros grupos de pesquisas⁸⁻¹¹. Segundo Farrock et al¹², poucos trabalhos têm sido realizados no desenvolvimento de biofilmes de STEC dentro do contexto de produtos lácteos, embora saiba-se que, como outras bactérias, a STEC O157:H7 é capaz de aderir e formar biofilmes em superfícies que são comumente utilizadas em ambientes de processamento de alimentos como aço inoxidável. Portanto, os dados apresentados neste trabalho são importantes para confirmar a capacidade de cepas de STEC não-O157 formarem biofilmes em superfícies que são comumente utilizadas na indústria de alimentos, que podem servir como fonte de contaminação cruzada, acarretando casos e surtos de doenças veiculadas por alimentos. Nesse âmbito, realizou-se também a avaliação da eficiência de sanitizantes de uso industrial na remoção de biofilmes formados, visando a inocuidade alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas utilizadas no presente trabalho foram STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8, isoladas de bovino no estado do Rio de Janeiro¹³. A identificação destes micro-organismos foi confirmada por observação microscópica dos aspectos morfológicos e tintoriais em lâminas com esfregaço corado pelo método de Gram, testes bioquímicos¹⁴ e pesquisa por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dos genes produtores de toxina Shiga *stx1* e *stx2*¹³.

A capacidade de formação de biofilme foi testada em cupons de aço inoxidável AISI 304 com acabamento número 4 (#4). O material com estas especificações é o mais utilizado pela indústria de alimentos na construção de equipamentos, bancadas e utensílios em geral. Foram utilizados cupons com dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm¹⁵. Cada cupom de aço inoxidável estéril foi imerso em tubo contendo 10 mL de *Tripticase Soy Broth* (TSB) com suspensão de células das STEC de 10³ UFC/mL. Essa população foi verificada, em todos os experimentos, por semeadura em placas. Os cupons foram incubados a temperatura de 25 °C e avaliadas quanto à formação de biofilme nos tempos 6, 12, 24 e 48 h. Como controle utilizou-se cupons imersos no meio de cultivo estéril não inoculado.

Os cupons de aço inoxidável foram retirados do meio de cultivo TSB com o auxílio de uma pinça estéril e foram imersos em 10 mL de *Phosphate Buffer Salt* (PBS), por 1 min, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de PBS e agitados em vortex, durante 2 min para remoção de células sésseis¹⁶. Diluições seriadas adequadas foram transferidas pelo método de plaqueamento em superfície para placas de Petri contendo TSA (Difco®) e incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h, determinando-se desta forma, o número de UFC/cm² aderidas a cada cupom¹⁵.

Na avaliação da eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio, soluções nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹ foram preparadas em água destilada esterilizada, com no máximo 15 min de antecedência ao uso. Os cupons foram

retirados dos meios de cultivo TSB inoculado com STECs após 6, 12 e 24 h, com o auxílio de uma pinça esterilizada, imersos em 10 mL de PBS por 1 min e enxaguados com água peptonada 0,1 % para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos contendo 10 mL das soluções sanitizantes. Após o tempo de contato de 15 min, os cupons foram transferidos para tubos contendo 5 mL de PBS adicionado de tiosulfato de sódio a 1 %, para a inativação da ação do sanitizante. Os cupons foram agitados em vórtex por 2 min para remoção das células sésseis. Foram preparadas as diluições apropriadas, semeadas em *Trypticase Soy Agar* (TSA) e incubadas a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h.

Foi realizada simultaneamente a enumeração da população dos cupons controles, ou seja, aqueles que não receberam o sanitizante. Esta contagem foi utilizada para avaliar o efeito dos sanitizantes sobre os biofilmes formados. Foram realizados três experimentos independentes, tanto para a formação de biofilmes microbianos quanto na eficácia dos sanitizantes, em duplicata, tendo sido o tratamento estatístico dos resultados obtido pela análise de variância (ANOVA) em delineamento inteiramente casualizado, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Para comparação entre as médias foi utilizado

o teste de comparação múltipla de Tukey. Para tal, foi utilizado o programa *Graph Pad Prism*®, versão 5.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução do número de células sésseis aderidas à superfície de aço inoxidável após remoção das células planctônicas, caracterizando a formação de biofilmes dos isolados de STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8 é apresentada na Figura 1.

As maiores contagens de células sésseis de STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8 nos cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, foram encontradas após 48 horas, com valores médios de 6,04 log UFC/cm², 5,86 log UFC/cm² e 5,90 log UFC/cm², respectivamente, caracterizando a formação de biofilmes microbianos, pois as contagens referem-se à células sésseis que ficaram aderidas à superfície, mesmo após a retirada das células planctônicas.

Houve diferença significativa entre todos os tempos de formação de biofilmes das STEC estudadas (6, 24 e 48 h). Na análise entre as cepas amostradas, constatou-se diferença significativa entre os mesmos tempos das diferentes cepas, com exceção do tempo de 24 h, quando comparou-se STEC O153:H25 e STEC O111:H8 e no tempo de 48 h, quando comparou-se STEC O113:H21 e STEC O111:H8.

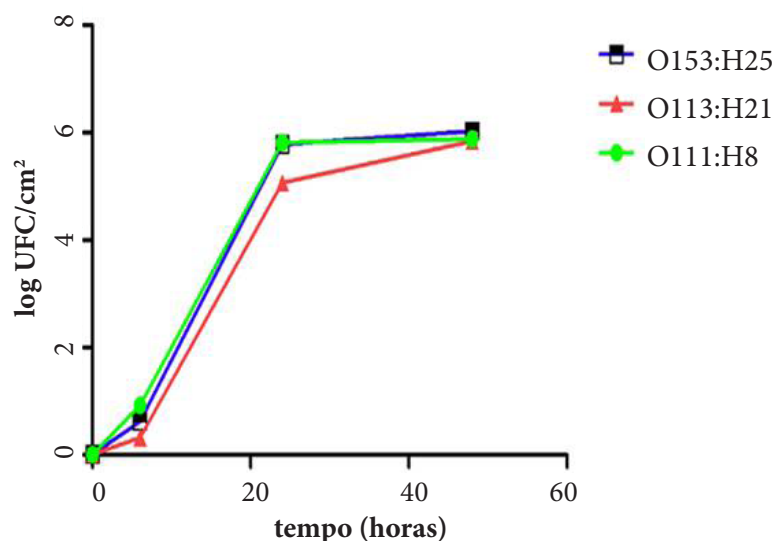


Figura 1. Evolução da população (log UFC/cm²) de células sésseis de isolados de *E. coli* STEC não-0157 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304#4. Cada ponto corresponde à média de três repetições em triplicata

Analisando os diferentes tempos, na maior parte foi encontrada diferença significativa, com exceção da STEC O113:H21 (contagem de 48 h) comparada à STEC O111:H8 no tempo de 24 h.

Os dados resultantes deste trabalho contribuem com informações na literatura científica sobre a formação de biofilmes microbianos de cepas de STEC não-O157. Estudos sobre a formação de biofilmes em STEC são principalmente relatados ao sorotipo O157:H7 e há poucos dados relacionados à formação de biofilmes em outros sorotipos^{12,17,18}. Este fato é preocupante, pois há diferenças na capacidade de adesão entre os diferentes sorotipos como observado no presente trabalho. O conhecimento sobre o comportamento destes microrganismos em aderir e formar biofilmes nas diferentes superfícies do processamento de alimentos é imprescindível para a inocuidade de alimentos e adequação dos processos de higienização para prevenir contaminações cruzadas.

Rivas et al¹⁹ avaliaram a capacidade de formação de biofilmes por dez diferentes cepas de *E.coli*, sendo sete de STEC (O157:H7, O157:H-, O91:H21 e O174:H21) e três de não-STEC (não toxigênico O157:HR, O13rel:H4 e O1:H7), por duas metodologias, a avaliação por microplacas de poliestireno e superfícies de aço inoxidável e demonstraram que cada cepa tem habilidade diferente de formação de biofilme em cada superfície e que todas as cepas possuíam a capacidade de se aderir em superfície de aço inoxidável, fato este que não ocorreu na metodologia de microplacas. Os autores sugeriram que a produção de biofilmes em microplaca de poliestireno pode não ser apropriada para representar outras superfícies e que se deve ter atenção ao escolher o método de quantificação de biofilme em superfícies. Os mesmos autores reforçaram a necessidade da pesquisa da capacidade de formação de biofilmes por cepas de interesse, por terem comportamentos diferentes.

A formação de biofilmes por *E.coli* STEC é associada à expressão de diferentes adesinas como, por exemplo, fimbria tipo1, curli, Ag43, Cah e EhaA¹⁷. Biscola et al¹⁷, ao estudarem a formação de biofilmes, verificaram a

presença de genes relacionados a diferentes adesinas, em 18 cepas de O157 e 33 cepas não-O157, observaram a formação em 5/18 (28 %) cepas de O157 STEC e 17/33 (51 %) de não O157 a temperatura de 28 °C por 48 h. A pesquisa de genes associados com adesão é importante, porém estes podem não ser expressos, dependendo das condições ambientais. Por este motivo, a avaliação da formação de biofilmes em aço é essencial para demonstrar a característica fenotípica.

Segundo Meyer²⁰, existem três estratégias para se tentar solucionar os problemas dos biofilmes: i) sanitização antes da sua formação, ii) sanitização após sua formação, ou iii) utilização de materiais que não favoreçam a formação dos mesmos. Neste sentido, foi testado o sanitizante mais comumente utilizado nas superfícies do processamento de alimentos, o hipoclorito de sódio em duas concentrações usualmente utilizadas, 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹²¹, por ser eficiente e de baixo custo. No presente estudo, as contagens iniciais de células sésseis das cepas das STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8 foram reduzidas aos níveis inferiores a 1 log UFC/cm² após sanitização com hipoclorito de sódio 100mg.L⁻¹ e 200mg.L⁻¹ conforme observa-se nas Figuras 2 a 4. Estes dados são importantes, pois se observa que se utilizados de forma correta, o agente sanitizante para estas cepas, são eficazes, considerando-se a importância da correta elaboração e implantação do programa de higienização de processamento da matéria-prima e na planta de processamento de alimentos. Ressalta-se a importância da observação dos critérios de utilização deste produto, pois o hipoclorito de sódio possui baixa estabilidade e sofre influência da luz, temperatura e pH, afetando sua eficiência.

Há poucos trabalhos sobre a suscetibilidade de cepas de *E.coli* STEC não-O157 produtoras de toxina Shiga a sanitizantes¹⁸, o que reforça a necessidade de maior pesquisa nesta área, considerando que surtos epidêmicos ou casos esporádicos graves são causados principalmente pelos sorotipos O157: H7, O157: H-, O26: H11, O111: H8, O111: H-, O103: H2, O113: H21 e O145: H-¹⁻⁴.

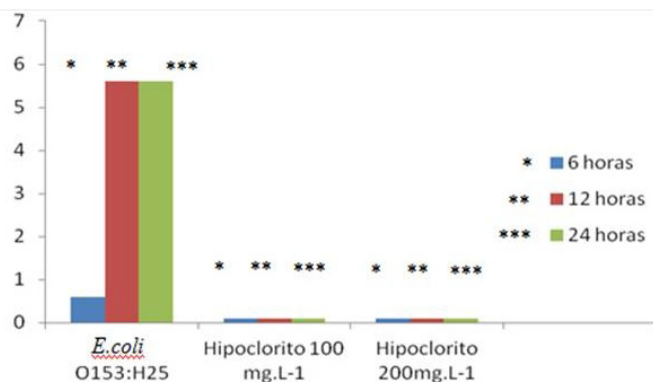


Figura 2. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* STEC O153:H25, formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4

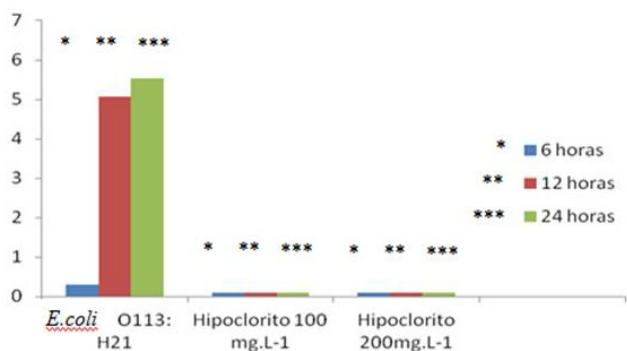


Figura 3. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* STEC O113:H21, formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4

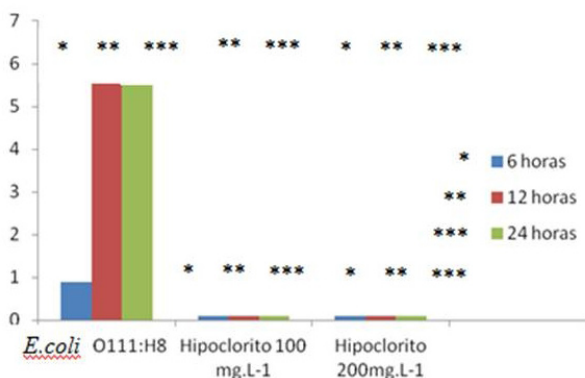


Figura 4. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* STEC O111:H8 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que cepas de STEC não-O157, sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 isolados no país, apresentam a capacidade de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, o que serve de alerta para a importância dos programas de sanitização preventivos. O hipoclorito de sódio nas concentrações utilizadas neste estudo foi eficiente para reduzir a contagem de células sésseis dos biofilmes, ressaltando a importância do correto programa de higienização na inocuidade dos alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Caprioli A, Tozzi AE, Rizzoni G, Karch H. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Infect Dis*.1997;3:578-9. [DOI: 10.3201/eid0304.970425].
2. Ethelberg S, Smith B, Torpdahl M, Lisby M, Boel J, Jensen T et al. Outbreak of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. *Clinic Infect Dis*. 2009;48:78-81. [DOI: 10.1086/597502].
3. Johnson RP, Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick SA et al. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot*. 1996;59(10):1112-22.
4. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eae, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb0111, and rfb0157. *J Clin Microbiol*. 1998;36:598-602.
5. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheurtz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of health domestical animals. *J Clin Microbiol*.1993;31:2483-8.
6. Vogeeler P, Tremblay YDN, Mafu AA, Jacques M, Harel J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*.2014;5(317):1-12. [DOI:10.3389/fmicb.2014.00317].

7. Wang R, Bono JL, Kalchayanand N, Shackelford S, Harhay DM. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strain and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *J Food Prot.*2012;75(8):1418-28. [DOI:10.4315/0362-028x.jfp-11-427].
8. Zottola EA, Sasahara KC. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *Int J Food Microbiol.*1994;23:125-48. [DOI: 10.1016/0168-1605(94)90047-7].
9. Gândara ALN, Oliveira JS. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. *Ciênc Tecnol Aliment.*2000;20(1):1-7. [DOI: 10.1590/S0101-20612000000100001].
10. Sharma M, Anand SK. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control.*2002;13(6-7):469-77. [DOI: 10.1016/S0956-7135(01)00068-8].
11. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Tech.* 2009;20(9):407-13. [DOI: 10.1016/j.tifs.2009.01.054].
12. Farrockh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppgaard H, Raynaud S et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol.*2013;162:190-212. [DOI:10.1016/j.ifofoodmicro.2012.08.008].
13. Gonzalez AGM. Características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no Estado do Rio de Janeiro [tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
14. Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol.*1993;39(2):155-8.
15. Esper RML. Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*: *Quorum sensing*, formação de biofilme e ação de sanitizante [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2010.
16. Parizzi SQF, Andrade NJ, Silva CAS, Soares NFFS, Silva EAM. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz Arch Biol Technol.*2004;47(1):77-83. [DOI: 10.1590/S1516-89132004000100011].
17. Biscola FT, Abe CM, Guth BEC. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl Environ Microbiol.*2011;77(7):2201-08. [DOI:10.1128/AEM.01920-10].
18. Fouladkhah A, Geornaras I, Sofos JN. Biofilm formation of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella Typhimurium* and Newport and their inactivation by sanitizers. *J Food Sci.*2013;78:880-6. [DOI: 10.1111/1750-3841.12123].
19. Rivas L, Dykes GA, Fegan N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and microtitre plate method. *J Microbiol Meth.*2007;69:44-51. [DOI: 10.1111/1750-3841.12123].
20. Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeter Biodegr.* 2003;51(4):249-53. [DOI: 10.1016/20964-8305(03)00047-7].
21. Santos MV. Boas Práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. *In: O Brasil e a nova era do mercado do leite – Compreender para competir.* 1ª ed. Piracicaba: Agripoint Ltda; 2007.p.135-54.