

FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Listeria monocytogenes* EM AÇO INOX E POLIESTIRENO

DARLA SILVEIRA VOLCAN¹; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA²; ISABELA SCHNEID³; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁴

¹Graduanda em Química de Alimentos, Bolsista PIBIC 1 – darlavalcan@yahoo.com.br

²Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos- tkvgandra@yahoo.com.br

³Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos- isabelaschneid@gmail.com

⁴Professor Associado Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial– wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria frequentemente encontrada em plantas processadoras de alimentos, podendo se aderir e se multiplicar em pontos com difícil acesso aos procedimentos de higienização (HOOD & ZOTTOLA, 1995).

Sob determinadas condições, esse patógeno pode aderir-se a superfícies abióticas e multiplicar-se, formando uma massa celular que pode agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, denominada biofilme (COSTERTON et al., 1995). A formação de biofilme em instalações industriais pode contaminar os alimentos prontos para o consumo, podendo trazer riscos à saúde dos consumidores (GUERRA et al., 2005).

Nesse contexto, os objetivos do trabalho foram analisar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *L. monocytogenes* em micro-placa de poliestireno e em superfície de aço inox em diferentes temperaturas e tempos de contato.

2. METODOLOGIA

Cinco isolados de *L. monocytogenes* (Tabela 1), pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA, UFPel, foram avaliados em triplicata, quanto a capacidade de adesão em microplacas de poliestireno (STEPANOVIC et al., 2007) e em duplicata em superfícies de aço inoxidável (RIEU et al., 2007).

Tabela 1. Isolados de *L. monocytogenes* utilizados para avaliação da formação de biofilme.

Isolado	Fonte	Ano de sorotipagem	Sorotipo
LA003	Carcaça ovina	2007	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a
LA016	Queijo colonial	2009	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b
LA019	Massa embutido	2001	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a
LA035	Carcaça de frango	2006	<i>L. monocytogenes</i> 4e
LA039	Carcaça de frango	2006	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a

A formação de biofilme em microplacas foi avaliada por Densidade ótica a 595nm (DO₅₉₅) e as concentrações bacterianas aderidas no aço inox foram avaliadas por contagem (Log UFC.cm⁻²). Após, os resultados foram tabulados e submetidos à ANOVA, seguido do teste de média de Tukey, com o auxílio do software STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os critérios estabelecidos por Stepanovic et al. (2007), dos cinco isolados de *L. monocytogenes* analisados, apenas o isolado LA003 não formou biofilme, diferindo significativamente ($p < 0,005$) dos isolados LA035 e LA039. O isolado LA019, considerado formador de biofilme, também diferiu significativamente do isolado LA039 (maior média de DO), e não diferiu dos demais (Figura 1). Assim, pode-se perceber que dentro do mesmo sorotipo houve diferença quanto à formação de biofilme, semelhante ao demonstrado por Foong e Dickson (2004).

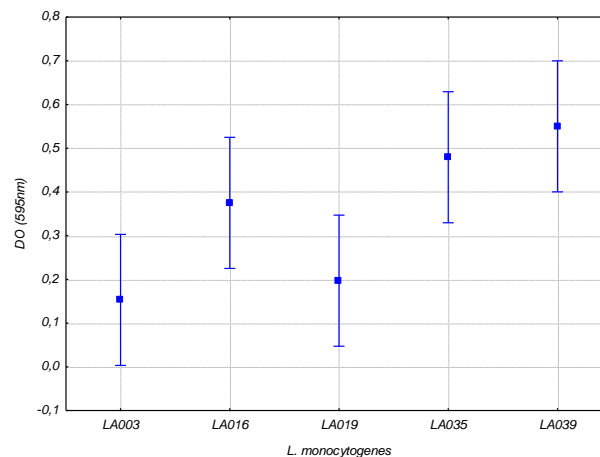


Figura 1. Média de densidade ótica (DO) dos isolados de *L. monocytogenes* em biofilme em microplacas de poliestireno

Os resultados da aderência dos isolados de *L. monocytogenes* em aço inox em diferentes tempos e temperaturas de contato são mostrados nas Figuras 2 e 3. Como pode ser visualizado na Figura 2, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações celulares dos isolados a 10°C, entretanto, a 20°C, o isolado LA039 apresentou uma concentração bacteriana significativamente menor ($p < 0,05$) que o LA019. A 37°C, o LA019 cresceu significativamente mais ($p < 0,05$) do que o isolado LA003. Não houve diferença entre sorotipos ou origem dos isolados sobre a aderência no cupom de inox.

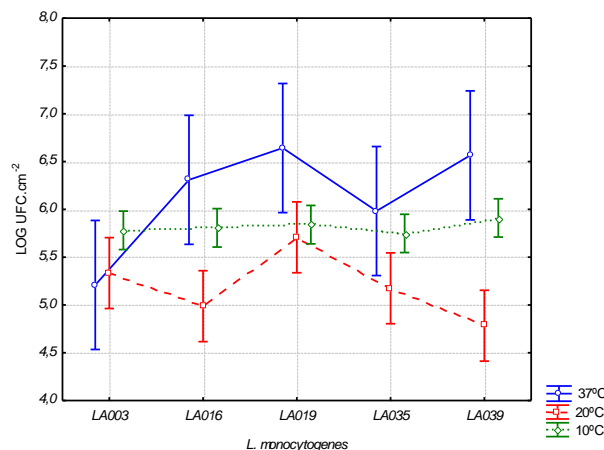


Figura 2. Média de concentração celular dos isolados de *L. monocytogenes* em aço inox em diferentes temperaturas de contato

Utilizando-se os critérios propostos por WINKELSTRÖTER (2008), o qual considera formação de biofilme em aço inox concentrações bacterianas superiores a 3 Log UFC.cm⁻², todos os isolados testados foram formadores de biofilme, não havendo interferência da fonte de isolamento, sorotipo ou dos tempos e temperaturas de incubação analisados.

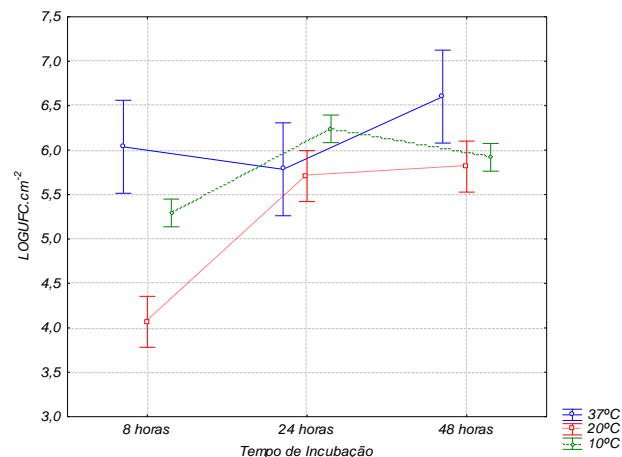


Figura 3. – Média das concentrações celulares dos isolados de *L. monocytogenes* em diferentes tempos e temperaturas em aço inox

Houve diferença significativa na concentração microbiana nos tempos de incubação testados, a 10°C e a 20°C. O tempo de 8h apresentou uma concentração bacteriana média significativamente menor ($p < 0,05$) que os outros dois tempos avaliados. Entretanto, a 37°C não foram observadas diferenças significativas nas concentrações bacterianas em todos os tempos avaliados. Estas diferenças nas concentrações celulares nas distintas temperaturas se devem, possivelmente, ao tempo de adaptação do micro-organismo.

De acordo com Gueriri et al. (2008) o desenvolvimento de biofilme depende das condições ambientais como pH, composição do meio de crescimento e temperatura, bem como das propriedades da superfície. Macedo (2006) descreve que a adesão é um processo que ocorre em duas fases. Na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do micro-organismo na superfície ocorrer por forças de Van der Waals e por atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou proteica, o qual dá suporte à formação de biofilmes.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *L. monocytogenes* analisados são capazes de formar biofilme e se aderirem em superfícies presentes na indústria de alimentos, como o aço inox e o poliestireno. Além disso, a concentração celular de *L. monocytogenes* presente em biofilme no aço inox pode ser influenciada pelo tempo e temperatura de contato.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Processo 11/1271-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 482524/2010-3) pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela concessão da Bolsa PIBIC

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

FOONG, S. C.; DICKSON, J. S. Attachment of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 456-462, 2004.

GUERRA, N. P.; ARAUJO, A. B.; BARRERA, A. M.; AGRASAR, A. T.; MACÍAS, C. L.; CARBALLO, J.; PASTRANA, L. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. **Journal of Food Protection**, v. 68, p.1012-1019, 2005.

GUERIRI, I.; CYNCYNATUS, C.; DUBRAC, S.; ARANA, A. T.; DUSSURGET, O.; MSADEK, T. The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. **Microbiology**, v. 154, p. 2251-2264, 2008.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 9-18, 1995.

MACEDO, J. A. B. MILKNET. **Biofilmes Bacterianos: Uma Preocupação Para a Indústria de Alimentos**. 18 de julho de 2006. Acessado em 4 set. 2006. Online. Disponível em: <http://www.milknet.com.br>.

RIEU, A.; WEIDMANN, S.; GARMYN, D. agr System of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role Adherence and Differential Expression Pattern. **Applied and environmental microbiology**. v.73, n.19, 2007.

STATSOFT, **Statistica 7,0 for Windows, Computer Program Manual**. Tulsa: StatSoft, Inc., 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. **Journal Compilation**, 115: 891–9, 2007.

WINKELSTRÖTER, L. K. **Quantificação e análise de viabilidade de *Listeria monocytogenes* em biofilmes por semeadura em placa, microscopia de fluorescência e ensaios preliminares de PCR em tempo real**. 2008, 104f. Dissertação (Mestre em Biociências aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.