

POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE CARCAÇAS BOVINAS

LAÍS ABREU ANASTÁCIO¹; PÂMELA INCHAUSPE CORREA ALVES²; GIOVANA FALEIRO WINK²; ISABELA SCHNEID KRONING²; GRACIELA VOLZ LOPES²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – anastacio.alais@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com; giovanawink@gmail.com; isabelaschneid@gmail.com; gracielavlopes@yahoo.com.br

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

1. INTRODUÇÃO

Em abatedouros-frigoríficos existem diversos pontos críticos a serem controlados durante as operações de abate, visando a qualidade microbiológica de carcaças bovinas (BRASIL, 1998). Uma vez na linha de abate, as carcaças passam por etapas em que são utilizados equipamentos e utensílios fabricados com materiais nos quais pode ocorrer a adesão de micro-organismos patogênicos, uma vez que esses estejam no ambiente, propiciando assim a formação de biofilme bacteriano (BYUN et al., 2022; RAMIRES et al., 2020; KRONING et al., 2016). O biofilme é definido como um ecossistema microbiano formado por células bacterianas ligadas umas às outras ou aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (LIU et al., 2004). Em ambientes de processamento de alimentos, o biofilme protege as células bacterianas de situações adversas (GU et al., 2021; YOSHIKAWA et al., 2018), contribuindo para a sua sobrevivência e desempenhando um papel fundamental na disseminação de bactérias de importância em alimentos (MENON, 2016; YANG et al., 2016).

No que diz respeito a contaminação bacteriana, *Listeria monocytogenes* é um importante patógeno em alimentos. Além de se multiplicar sob temperaturas de refrigeração, esse micro-organismo também possui a capacidade de persistir em equipamentos e utensílios de plantas de processamento, através da formação de biofilme (BYUN et al., 2022; RAMIRES et al., 2020; DORTET et al., 2014). Mesmo com rigorosos controles de boas práticas ao longo dos procedimentos operacionais de abate, a etapa de refrigeração, onde as carcaças permanecem por, no mínimo 24 horas, é um ponto adicional de perigo de contaminação por *L. monocytogenes*, visto ser este um patógeno psicrotrófico. A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode causar uma grave infecção, denominada listeriose (LEPE, 2020). Segundo o European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC, 2018), foram relatados 225 óbitos em 1633 casos de listeriose confirmados na União Europeia, estabelecendo a taxa de letalidade da listeriose (13,77%) como a maior entre todas as doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Uma vez que biofilmes bacterianos representam a principal fonte de contaminação por micro-organismos patogênicos em alimentos, assim como a principal razão para surtos de DTA (CDC, 2021; YANG et al., 2016), o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de formação de biofilme em aço inoxidável (AI) por isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças de bovinos abatidos em abatedouros-frigoríficos do sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram avaliados doze isolados de *L. monocytogenes* (identificados de B1 a B12), previamente caracterizados, provenientes de carcaças bovinas, oriundas de

dois abatedouros-frigoríficos da região sul do Rio Grande do Sul (IGLESIAS et al., 2017). O potencial de formação de biofilme foi avaliado em cupons de aço inoxidável AISI 304 (rugosidade de 0,366 μm , 10 mm x 10 mm x 1 mm). Os isolados de *L. monocytogenes* foram incubados em ágar Triptona de soja (TSA, Acumedia®) por 24 h, a 37 °C. Posteriormente, preparou-se uma suspensão celular com solução salina 0,85%, acrescida de concentração celular equivalente a 10^8 UFC.mL⁻¹ (0,5 da escala de McFarland). Desse inóculo, uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubos de ensaio contendo cupons de AI e 9 mL de caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia®). Os tubos foram incubados a 4 °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, Oxoid®) 0,1%, onde ficaram imersos em repouso por 1 minuto. Nessa etapa ocorreu a remoção de células fracamente aderidas (planctônicas). Na etapa subsequente, os cupons foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de AP 0,1% e homogeneizados por 2 min para remoção de células fortemente aderidas (sésseis) (ANDRADE et al., 1998). Em seguida, procederam-se diluições decimais seriadas em microtubos contendo 0,9 mL de AP 0,1%. 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 AI foram realizados em triplicata. Os dados foram submetidos a uma análise de comparação de médias pelo teste T-Tukey ($p < 0,05$) para avaliar o efeito de diferentes temperaturas na formação de biofilme.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo WIRTANEN (1996), 3 log UFC.cm⁻² é considerada a contagem mínima necessária para que um micro-organismo apresente capacidade de formar biofilme em uma determinada superfície. Conforme pode ser observado na Figura 1, todos os isolados avaliados ($n=12$) apresentaram capacidade de formar biofilme, independente da temperatura avaliada. Em relação a temperatura de 37 °C, a menor contagem constatada foi de 6,09 log UFC.cm⁻², pelo isolado B6, enquanto a maior foi de 7,7 log UFC.cm⁻², pelo isolado B3. A 4 °C, a menor contagem foi de 4,05 log UFC.cm⁻², pelo isolado B1, enquanto a maior contagem foi de 5,38 log UFC.cm⁻², pelos isolado B6 e B8 (Figura 1). A maior média de formação de biofilme foi observada a 37 °C (6,94 log UFC.cm⁻²), enquanto a menor média foi observada a 4 °C (4,89 log UFC.cm⁻²). Considerando esses resultados, foi possível identificar que os isolados possuem significativamente ($p < 0,05$) maior potencial de formação de biofilme a 37 °C.

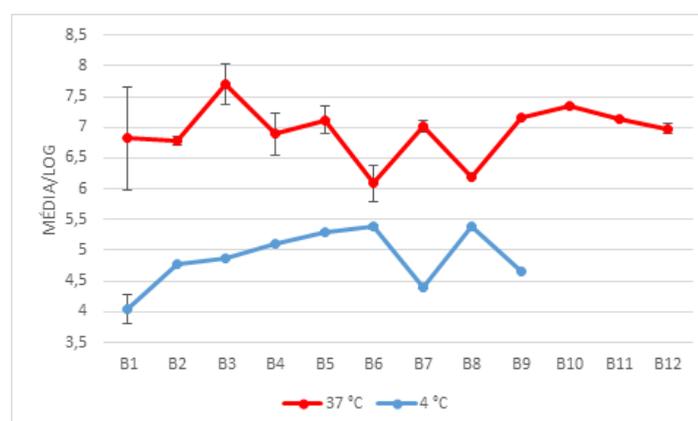


Figura 1. Formação de biofilme por isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças bovinas em aço inoxidável nas temperaturas de 4 °C e 37 °C

A capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* tem sido estudada sob diversas condições de temperatura (RAMIRES et al., 2020; GU et al., 2021) e os resultados demonstram que a produção de biofilme é diretamente relacionada ao aumento da temperatura de incubação (KADAM et al., 2013), assim como foi observado neste estudo. BYUN et al. (2022) avaliaram a capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* a 4 °C e encontraram valores entre 4 e 5 log UFC.cm⁻². Já SHOWRON et al. (2019) avaliaram a habilidade de formação de biofilme de *L. monocytogenes* a 37 °C e encontraram média de 6,81 log UFC.cm⁻². Esses resultados corroboram os obtidos neste estudo, tanto em relação a temperatura de 4 °C, quanto a 37 °C.

Listeria monocytogenes é um micro-organismo psicotrófico, que sobrevive e se multiplica sob uma ampla faixa de temperatura, inclusive em temperaturas de refrigeração comumente utilizadas para a conservação de alimentos (DORTET, 2014). Por esse motivo, foram escolhidas as temperaturas de 4 °C (temperatura média de câmaras frias) e 37 °C (temperatura ótima de multiplicação do patógeno). Ressalta-se que não há normativas que regulamentem a temperatura das câmaras frias nos estabelecimentos de abate brasileiros, porém, é comum que as indústrias mantenham as temperaturas dessas seções entre 3 °C e 5 °C.

Os resultados obtidos demonstram que os isolados avaliados são capazes de formar biofilme em AI, material muito utilizado em indústrias de alimentos. Tendo em vista que *L. monocytogenes* é um importante patógeno de origem alimentar, esses resultados são preocupantes, uma vez que o biofilme formado pelo micro-organismo pode atuar como fonte de contaminação, afetando a segurança do produto final.

4. CONCLUSÕES

A habilidade para formar biofilme demonstrada pelos isolados de *L. monocytogenes* avaliados no presente estudo indica sua capacidade para persistir na linha de abate, podendo se tornar uma fonte constante de contaminação em abatedouros-frigoríficos, e representando um perigo à saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional De Controle De Patógenos**. Maio de 2017. Acessado em 01 de agosto de 2022. Online. Disponível em: www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998**. Diário Oficial de União, Brasília, 1998.
- BYUN et al. Biofilm eradication ability of phage cocktail against *Listeria monocytogenes* biofilms formed on food contact materials and effect on virulence-related genes and biofilm structure. **Food Research International**, v157, 2022.
- CDC, 2021. **Listeria Homepage**. Centers for Disease Control and Prevention Acessado em 15 de julho de 2022. Online. Disponível em: [https:// www.cdc.gov/listeria/index.html](https://www.cdc.gov/listeria/index.html).
- DORTET, L. *Listeria monocytogenes*. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2014.
- ECDC & EFSA, 2019. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2019. **Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 infections linked to ready-to-eat meat products – 25 November 2019**.

- ECDC & EFSA, 2018. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017**. *EFSA J.* 16 (5500), 5262.
- GU et al. *Listeria monocytogenes* biofilm formation as affected by stainless steel surface topography and coating composition. **Food Control**, 2021
- IGLESIAS et al. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, 2017
- KRONING et al. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v.58, p.105-111, 2016.
- LEPE, A. J. Current aspects of listeriosis. **Medicina Clínica**, Spain, v. 154, n. 11, p. 453-458, 2020.
- LIU et al. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v65(2), p143–148, 2004.
- MENON, K.V. Biofilm and food industry. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.**, v.3, p.137-142, 2016.
- RAMIRES et al. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. **Food Research International**, v.140, 2020.
- SKOWRON et al. Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v296, p75–82, 2019.
- WIRTANEN et al. 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**, v59(7), p727-733, 1996.
- YANG et al. Proteins dominate in the surface layers formed on materials exposed to extracellular polymeric substances from bacterial cultures. **Biofouling**, v.32, p.95-108, 2016.
- YOSHIKAWA et al. Sequence-based characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from domestic retail meat in the Tokyo metropolitan area of Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 2018.