

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*
PROVENIENTES DE CARNE DE FRANGO

**KAREN DAMASCENO DE SOUZA¹; FERNANDA DEMOLINER²; JOZI
FAGUNDES DE MELLO²; KELLY LAMEIRO RODRIGUES²; ELIEZER ÁVILA
GANDRA³**

¹Universidade Federal de Pelotas – karen_damasceno@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fernandademoliner@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – jozimello@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lameiro_78@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da exigência do consumidor em relação a qualidade higiênico-sanitária da carne, a atenção dos produtores está sendo focada na melhoria da qualidade microbiológica e segurança dos alimentos. Produtos cárneos estão frequentemente associados a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), uma vez que a carne é um alimento ideal para o desenvolvimento de bactérias (DOULGERAKI et al., 2012).

Bactérias pertencentes ao gênero *Listeria* apresenta capacidade de multiplicação e sobrevivência em temperaturas de refrigeração, sendo possível, portanto, o seu desenvolvimento em câmaras frias ou ao longo da cadeia do frio, na qual a carne é comumente armazenada (JAY, 2005). *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica de grande relevância por ser responsável pela listeriose, doença grave que possui alta taxa de mortalidade em grupo de risco (20-30%) (GÓMEZ et al., 2014).

As indústrias de alimentos, principalmente as de carnes, ainda enfrentam vários problemas relacionados aos processos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios, muitas vezes relacionados com a ineficácia destes produtos e dos processos de higienização na remoção de micro-organismos destes ambientes. Essas falhas podem tornar estes locais focos de contaminação cruzada. Isso ocorre, principalmente devido à formação de biofilmes bacterianos nos equipamentos e ambiente da linha de produção. Nesses locais, a formação de biofilme é muito favorável pelo fato de ser um ambiente com acúmulo de material orgânico e inorgânico, o qual é utilizado pelos micro-organismos para sua fixação na superfície e consequente desenvolvimento de biofilmes, onde as comunidades bacterianas podem se estabelecer e resistirem por longos períodos (UHITIL et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010).

Biofilme é um conjunto de micro-organismos de vida sésil, caracterizada pela adesão desses micro-organismos a superfícies sólidas, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. A formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas das células planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de sobrevivência dos micro-organismos em ambientes com condições adversas. A matriz polimérica é uma estrutura complexa, podendo ser composta por proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e heteropolímeros, tais como glicoproteínas e fosfolipídios. Ela é responsável pela estrutura do biofilme e a sua composição determina algumas propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes. Uma de suas propriedades é a de tornar-se impermeável a certos agentes antimicrobianos, impedindo a sua difusão (HOUDT; MICHIELS. 2010).

Diante desse contexto, cabe salientar a importância de estudos que visam ampliar conhecimentos sobre bactérias patogênicas, destacando *L. monocytogenes*, provenientes, principalmente de alimentos de origem animal, como carnes de frango. Além disso, é importante conhecer o processo de formação de biofilme dessas bactérias na indústria de alimentos, possibilitando a tomada de medidas preventivas e corretivas no decorrer da cadeia alimentícia para garantir a saúde do consumidor.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças e cortes de carnes de frango de um frigorífico e do comércio varejista da região de Pelotas, RS.

2. METODOLOGIA

Foram analisados 5 isolados de *L. monocytogenes* sendo 3 provenientes de carcaças de frango de um frigorífico abatedouro e 2 provenientes de cortes de frango do comércio varejista da região de Pelotas, RS. Os isolados tiveram a espécie confirmada através da identificação sorológica realizada pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A capacidade de formação de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes* foram avaliados em microplacas de poliestireno através do método proposto por STEPANOVIC et al. (2007), com modificações. Os isolados foram cultivados em Ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia®) a 37 °C durante 18 horas e após, a concentração bacteriana da solução foi padronizada pela escala de McFarland no valor de 0,5, correspondente a 8 Log de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). Em seguida, uma alíquota de 20 µL da solução padronizada foi distribuída em poços da microplaca contendo caldo BHI (180 µL) e incubada a 35 °C durante 24 horas. Como controle negativo, utilizou-se 200 µL de caldo BHI sem inóculo e como controle positivo, utilizou-se 180 µL de caldo BHI e 20 µL da solução padronizada com *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923), previamente testado e classificado como formador de biofilme. As placas foram lavadas três vezes com 200 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), para remover as células não aderidas à placa. As microplacas foram invertidas sobre papel absorvente para a secagem e, posteriormente, as amostras foram fixadas com 150 µL de metanol (CH₃OH) durante 20 minutos. Após este período, o metanol foi descartado e as placas foram mantidas invertidas durante 18 horas. As células aderentes foram coradas com 150 µL de cristal violeta (0,5%) durante 15 minutos. O corante foi removido sob água corrente e após um período de 3 minutos de secagem, adicionou-se 150 µL de etanol (CH₃CH₂OH) (95%). As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos, e então, foi realizada a quantificação do biofilme. A densidade óptica (DO) do biofilme bacteriano foi quantificada com o auxílio de um leitor de microplacas (ThermoPlate®) a 450 nm.

A interpretação das leituras obtidas foi realizada como descrito por STEPANOVIC et al. (2007). Primeiramente, foi calculada a média das DO das amostras e do controle negativo, e então o valor de corte (DOc) foi calculado da seguinte forma:

$DOc = (\text{média da DO controle negativo} + 3 \times \text{desvio padrão do controle negativo})$. O valor final da DO das amostras testadas (DOf) foi dado por: $DOf = (\text{média da DO de cada amostra} - DOc)$.

As amostras foram divididas em categorias da seguinte forma:

$DOf \leq DOc$ = não formadora de biofilme;

$DOc < DOf \leq 2 \times DOc$ = fraca formadora de biofilme;

$2 \times DO_c < DO_f \leq 4 \times DO_c$ = moderada formadora de biofilme;
 $4 \times DO_c < DO_f$ = forte formadora de biofilme.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser visualizados os resultados referentes a classificação dos isolados de *L. monocytogenes* quanto a formação de biofilmes em placas de poliestireno, segundo os critérios de STEPANOVIC et al. (2007). Todos os isolados de *L. monocytogenes* foram formadores de biofilme, sendo classificados como fraco formador de biofilme.

Tabela 1: Classificação da formação de biofilme dos isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de carcaças e cortes de carnes de frango de um frigorífico e do comércio varejista da região de Pelotas, Brasil.

Classificação	Isolados de <i>L. monocytogenes</i> (5)			
Forte	0	0	0	0
Moderado	0	0	0	0
Fraco	0	0	5	0
Não formador	0	0	0	0

Por possuir flagelos, a adesão de *L. monocytogenes* a superfícies é facilitada, principalmente nas fases iniciais da formação do biofilme (VAN HOUDT; MICHIELS. 2010). A presença de um número elevado de *L. monocytogenes* formadora de biofilme, provenientes de carcaças e cortes de frango comprovam possíveis falhas de higiene na manipulação, na sanitização dos equipamentos e utensílios e até mesmo na conservação do produto.

A ameaça desta bactéria na indústria de alimentos é baseada na sua habilidade em crescer a largas faixas de temperatura, principalmente sob refrigeração (JAY, 2005). *L. monocytogenes* é capaz de aderir a superfícies de contato de alimentos e formar biofilmes, sendo mais resistentes e impedindo com isso a eficiência do processo de sanitização, o que irá aumentar a persistência bacteriana na indústria de alimentos e consequentemente aumentar as chances de contaminação após o processamento do produto (CHAE et al. 2006).

Estudos também encontram elevada capacidade de formação de biofilme de *L. monocytogenes*, isolados de produtos cárneos, em material de poliestireno (RODRIGUES et al. 2010; KADAM et al. 2013), o que mostra que este tipo de material, utilizado na indústria de alimentos, é favorável a colonização por biofilmes de *L. monocytogenes*.

Os resultados encontrados neste estudo denotam uma situação preocupante já que bactérias patogênicas como *L. monocytogenes* formadoras de biofilme representam sérios desafios para a indústria da carne, uma vez que estas podem levar a contaminação cruzada dos produtos, resultando em uma redução da vida de prateleira do alimento e em transmissão de doenças (MAIA et al., 2009; GIAOURIS et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, fica evidente a importância do controle de biofilmes microbianos na indústria de carnes, uma vez que no presente estudo pode-se constatar que todos os isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de carcaças e cortes de carne de frango do frigorífico e do comércio varejista, apresentaram capacidade de formação de biofilme.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOULGERAKI, A.I.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F.; NYCHAS, G.J.E. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**. V.157, p.130-14, 2012.
- GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Sci.**, v.97, n.3, p.298-309, 2014.
- GÓMEZ, D.; AZÓN, E.; MARCO, N.; CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; ARIÑO, A.; et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiology**. v.42, p.61-65, 2014.
- HOUDT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**. v.109, p.1117–1131, 2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre:Artmed, 2005.
- KADAM, S.R.; DEN BESTEN, H.M.W.; VAN DER VEEN, S.; ZWIETERING, M.H.; MOEZELAAR, R.; ABEE, T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin Sachin. **Int. J. Food Microbiol.** v.165, p.259–264, 2013.
- MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.29, n.1, p.114-119, 2009.
- OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.97-106, 2010.
- RODRIGUES, B.L.; SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N.N.; et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughter house. **Braz. J. Microbiol.** v.41, p.1082-1085, 2010.
- SHAE, M.C.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L.T.; MACKERETH, R. Effects os physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v. 23, n.3, p.250-259, 2006.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**. v.115, n.8 ,p.891-9, 2007.
- UHITIL, S., JAKSIC, S., PETRAK, T., MEDIC, H., GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. In cakes in Croatia. **Food Control**, v. 15, n.3, p.213-216, 2004.
- VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **J. Appl. Microbiol.** v.109, p.1117-1131, 2010.