

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Yersinia enterocolitica* ISOLADAS DE SUÍNOS

JULIA ROSIN DA SILVA¹; CAMILE MILAN²; CLÁUDIO DIAS TIMM³

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – julia_rosin@hotmail.com

²Mestre em Ciências – Universidade Federal de Pelotas – cami_milan@hotmail.com

³Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Departamento de Veterinária Preventiva – Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína animal mais produzida e consumida no mundo, seguida da carne de frango e carne bovina (USDA, 2016). Este alimento é constituído de 75% de água, 22,8% de proteína, 1,2% de gordura e 1,0% de minerais, além de ser uma excelente fonte de vitaminas hidrossolúveis do grupo B, bem como zinco, potássio, ferro e magnésio (ROÇA, 2008). No entanto, devido ao seu alto teor de umidade e nutrientes, a carne suína e seus derivados acabam tornando-se um importante veículo de transmissão de bactérias patogênicas, podendo causar Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (PARDI et al., 2006).

Yersinia enterocolitica, bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, anaerobia facultativa, pertence à família *Enterobacteriaceae* e cresce em temperatura ótima de 25 a 28°C (BOTTONE et al., 2005). É um importante patógeno causador de DTA, estando relacionado a casos de toxi-infecções alimentares (FORSYTHE, 2013). Devido à capacidade de se multiplicar a temperatura de 4°C, sendo esta uma bactéria psicrotrófica, pode manter-se viável em alimentos refrigerados, bem como congelados, entre eles carne, leite e seus derivados (CASTAÑEDA et al., 2001). A legislação brasileira não exige a pesquisa de *Y. enterocolitica* em alimentos, entretanto, este micro-organismo tem sido isolado de amostras de produtos de origem animal, como carne suína, carne bovina, ostras, peixe e leite cru (FALCÃO e FALCÃO, 2006).

Segundo Sesti (2005), *Y. enterocolitica* está entre as bactérias formadoras de biofilmes superficiais mais comuns. Biofilmes são complexos ecossistemas de micro-organismos sésseis que se aderem a uma superfície sólida (DONLAN e COSTERTON, 2002), formando uma camada espessa, na qual os micro-organismos continuam a se multiplicar (PARIZZI, 1998). Os biofilmes estruturam-se sobre diferentes tipos de superfícies, como por exemplo, aquelas utilizadas nas indústrias de alimentos, onde a capacidade de formação de biofilme é preocupante, porque a lavagem e a sanitização podem não garantir a eliminação completa dos micro-organismos (VIANA, 2006). Uma vez constituídos, os biofilmes atuam como fontes de contaminação constante, liberando células das bactérias que o estão constituindo, podendo comprometer a qualidade microbiológica dos alimentos e causar DTA (FUSTER-VALLS et al., 2008).

O presente estudo teve como objetivo verificar a capacidade de formação de biofilme por cepas de *Y. enterocolitica* isoladas de suínos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 22 cepas de *Y. enterocolitica* previamente isoladas de suínos por Moreira et al. (2017).

Os isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Dinamarca), seguindo a técnica descrita por Janssens et al. (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *Y. enterocolitica*. Foram colocados 200 µL de Caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia, EUA) em cada poço da placa de microtitulação, adicionados de 2 µL de culturas *overnight* em TSB de cada cepa padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para 0,8 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo TSB, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Então, a tampa, contendo vilosidades, foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes se formaram sobre as vilosidades das tampas. Para quantificação da formação de biofilmes, as tampas foram lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material que permaneceu ligado à tampa foi corado durante 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa foi secada em temperatura ambiente por 30 min. O biofilme com o corante ligado foi extraído com ácido acético glacial 30% (200 µL) e a DO₅₇₀ de cada poço foi medida. Cada cepa foi classificada como não formadora de biofilme, fracamente formadora, moderadamente formadora ou fortemente formadora, de acordo com os procedimentos sugeridos por Stepanovic et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles e a classificação foi determinada conforme segue.

DO ≤ DOc = não formadora

DOc < DO ≤ 2 x DOc = fraca formadora

2 x DOc < DO ≤ 4 x DOc = moderada formadora

4 x DOc < DO = forte formadora

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar que 9,1% (2/22) das cepas foram classificadas como fortes formadoras de biofilme. O mesmo valor foi obtido no que se refere ao número de cepas moderadas formadoras de biofilme. Já em relação as fracamente formadoras, caracterizaram-se 54,5% (12/22), e 27,3% (6/22) das cepas foram classificadas como não formadoras de biofilme.

Com estes resultados, observou-se que a maioria das cepas, ou seja, 72,7% (12/22) formaram biofilme, o que pode facilitar sua permanência em alimentos, bem como na superfície de utensílios, equipamentos e instalações que entram em contato com os suínos durante o fluxograma de abate. Devido a isso, a presença de micro-organismos formadores de biofilmes na indústria de alimentos resulta em graves problemas e, portanto, a capacidade das cepas testadas de formar biofilme é preocupante. Além disso, a bactéria estruturada no biofilme consegue suportar por mais tempo a privação de nutrientes, bem como mudanças de pH e desinfetantes, devido a presença de concentrações mais elevadas do micro-organismo (JEFFERSON, 2004; MILAN et al., 2015).

Portanto, os resultados obtidos demonstram a importância da implantação de efetivas práticas de limpeza e sanitização de equipamentos e superfícies que entram em contato com o produto na indústria de alimentos, a fim de evitar condições sob as quais *Y. enterocolitica* seja capaz de sobreviver, se multiplicar e, por consequência, formar biofilme.

4. CONCLUSÕES

Cepas de *Y. enterocolitica* isoladas de suínos apresentam capacidade de formar de biofilme, mesmo que a maioria delas fracamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTTONE, E. J.; BERCOVIER, H.; MOLLARET, H. H. Genus XLI. *Yersinia*, In: GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer: New York, p. 838–848, 2005.

CASTAÑEDA, E. P.; DÍAZ, A. E.; ANDRADE, H. L.; JARAMILLO ARANGO, C. J. Identificación y tipificación de biotipos y serotipos de *Yersinia enterocolitica*. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p. 380-384, 2001.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, p. 167-193, 2002.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO D. P. F. Importância de *Yersinia enterocolítica* em Microbiologia Médica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 27, n. 1, p. 9-19, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.

FUSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.

JANSSENS, J. C. A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D.; VERHOEVEN, T. L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; VOS, D. E.; KEERSMAECKER, S. C. J. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6639–6648, 2008.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.

MILAN, C.; AGOSTINETTO A.; CONCEIÇÃO. R. C. S.; GONZALEZ, H. L.; TIMM, C. D. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 642-646, 2015.

MOREIRA, L. M. **Fontes de contaminação de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate de suínos**. 2017. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da carne.** 2. ed. Goiânia, 2006. 623p.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência.** 1998. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

ROÇA, R.O. **Composição Química da Carne.** Acessado em: 20 set. 2017. Online. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca102.pdf>>

SESTI, L. A. C. Biosseguridade em granjas de produtores avícolas. In: MACARI, M.; MENDES, A. A. **Manejo de Matrizes de Corte.** 2^a ed. Campinas, 2005. p. 243-322.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade.** Acessado em: 19 set. 2017. Online. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite.** Viçosa: UFV, 2006. 159p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.