

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE SUSHIS

LISSETH PAMELA PERALTA CANCHIS¹; GABRIELA PEIL DA SILVA²; KAUANA DOS SANTOS SOARES²; TASSIANA RAMIREZ²; NATALIE RAUBER KLEINUBING², WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – ipc_07@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gabriela.peil19@gmail.com; kauana_soares@hotmail.com;
tassianaramires@gmail.com; natalierk10@gmail.com.

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

1. INTRODUÇÃO

Sushi e sashimi são alimentos tradicionais da culinária japonesa, preparados a base de arroz acidificado e peixe cru, que vêm ganhando o gosto dos consumidores de diversos países, inclusive no Brasil (LEISNER et al., 2014). Devido a sua grande manipulação e de serem prontos para o consumo, podem veicular diversas bactérias patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado, mesófilo, com caráter psicrotrófico e relativamente resistente ao sal, secagem e pH baixo (SEELINGER & JONES, 1986). É considerado um dos principais agentes patogênicos em alimentos (WIRTANEN & MATTILA-SANDHOLM, 1993). É o agente causador de listeriose em humanos e animais, sendo os alimentos a principal fonte de infecção (CARPENTIER & CERF, 1993). A listeriose é responsável por casos de aborto, meningite e septicemia, principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco, tais como imunodeprimidos, idosos, crianças e mulheres grávidas (CRUZ et al., 2008).

Essa bactéria tem capacidade de formar biofilme (WIRTANEN & MATTILA-SANDHOLM, 1993). Biofilmes bacterianos são descritos como comunidades bacterianas aderidas a superfícies bióticas e abióticas, formando microcolônias (COSTERTON & LEWANDOWSKI, 1995). Os biofilmes podem ser uma fonte contínua de contaminação por bactérias na indústria de alimentos, pois há dispersão constante de células bacterianas, principalmente quando os alimentos entram em contato com os biofilmes formados sobre as superfícies de equipamentos e utensílios (COSTERTON et al., 1987).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme em aço inox, por isolados de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de sushis comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul (RS).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados seis isolados de *L. monocytogenes* provenientes de sushis, oriundos de quatro coletas, em dois estabelecimentos (A e B), na cidade de Pelotas, RS. A formação de biofilme foi avaliada em cupons de aço inoxidável AISI 304 (0.366 µm rugosidade, 10 mm x 10 mm x 1 mm). Os seis isolados de *L. monocytogenes* foram cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia ®) durante 24 horas, a 37 °C. Após esse período, os isolados foram diluídos em solução salina 0,85% até a turbidez 0,5 na escala de McFarland ($\sim 10^8$ UFC.mL⁻¹) e foram realizadas diluições decimais seriadas até 10⁻³. A partir dessa concentração microbiana, foram aliquotados 1 mL para tubos de ensaio contendo

9 mL de caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia®), nos quais estavam imersos cupons de aço inoxidável de 1 cm².

Os tubos de ensaio foram incubados a 37 °C, durante 24 horas. Após esse período, os cupons foram transferidos para tubos tipo falcon contendo 5 mL de água Peptonada 0,1% (AP, Oxoid ®), e ficaram imersos por 1 minuto em repouso, para retirada das células planctônicas. Em seguida, os cupons foram transferidos para tubos tipo falcon contendo 10 mL de AP 0,1%, e submetidos a agitação em vortex por 2 minutos para retirada das células sésseis (ANDRADE, BRIDGEMAN & ZOTTOLA, 1998). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas em microtubo contendo 0,9 mL de AP 0,1%, e cada diluição foi semeada na superfície de placas de Petri contendo ágar TSA. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. O teste foi realizado em triplicata. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), empregando o teste de Fischer ($p<0,05$), utilizando o programa STATISTIX, versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis isolados de *L. monocytogenes* obtidos de sushi, apresentaram concentrações bacterianas entre 6,42 log UFC.cm⁻² e 7,19 log UFC.cm⁻², em aço inox, na temperatura de 37 °C, após 48 horas de incubação, conforme pode se observar na Tabela 1. De acordo com RONNER & WONG (1993) considera-se como biofilme, concentrações celulares bacterianas superiores a 5 log UFC.cm⁻².

Tabela 1. Contagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de sushis sob condições de biofilme em aço inox, a 37 °C, após 48 h de incubação

Isolados	Estabelecimento	Contagens (log UFC.cm ⁻²)	Média contagens (log UFC.cm ⁻²)
L 1	A	6,77	6,78 ^{AB}
		6,78	
L 10	A	6,92	6,95 ^{AB}
		6,99	
L 11	A	6,99	6,97 ^{AB}
		7,33	
L 17	A	7,31	7,19 ^A
		7,06	
L 16	B	6,79	6,42 ^B
		6,04	
L 20	B	6,82	6,82 ^{AB}
		6,81	

Letras diferentes representam diferença significativa ($p<0,05$) entre as médias

Os isolados L1, L10, L11 e L 17 são provenientes do estabelecimento A, enquanto os isolados L16 e L20 são oriundos do estabelecimento B. Observa-se que houve contaminação persistente por *L. monocytogenes*, haja vista que o patógeno foi isolado nos estabelecimentos, mesmo com um mês de intervalo entre as coletas. Considerando-se o potencial de formação de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes* avaliados, pode-se sugerir que a formação de biofilme bacteriano permitiu essa persistência. Segundo PHILLIPS (2016), biofilmes bacterianos podem estar presentes em equipamentos de

processamento e em superfícies de contato com alimentos, sendo uma fonte constante de contaminação. A persistência de *L. monocytogenes* em uma planta de processamento é a principal razão pela qual a bactéria é considerada um sério desafio aos padrões higiênicos e um maior fator de risco de transmissão de doenças transmitidas por alimentos (SIMÕES et al., 2010). Além disso, as técnicas rotineiras de sanitização, utilizadas nas indústrias de alimentos, não têm se mostrado eficazes no processo de remoção de biofilmes (KNIGHT & CRAVEN, 2010). A habilidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* tem sido relatada em diferentes condições de temperatura, como 12 °C, 20 °C, 30 °C e 37 °C, e tem se observado que quanto maior a temperatura, maior a formação de biofilme (KADAM et al., 2013).

De acordo com os resultados obtidos, os isolados avaliados apresentaram capacidade de formação de biofilme em aço inox, um material muito utilizado em indústrias de alimentos. Como *L. monocytogenes* é um importante patógeno alimentar, essa característica dos isolados é preocupante, tendo em vista que eles podem persistir em equipamentos e utensílios utilizados na produção de alimentos e contaminar o produto final, o que, provavelmente, ocorreu durante as coletas realizadas nos estabelecimentos onde esse estudo foi realizado.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de sushis comercializados na cidade de Pelotas, RS, apresentam capacidade de formação de biofilme em aço inox. Dessa forma, podem permanecer no ambiente de processamento e contaminar o produto final, trazendo riscos à saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

CARPENTIER, J.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **J. Appl. Bacteriol.**, v.75, p.499-511, 1993.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.L.; NICKEL J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Ann. Rev. Microbiol.** v.41, p.435–464,. 1987.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.** v.49, p.711–745,. 1995.

CRUZ, C.D; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: UM AGENTE INFECCIOSO AINDA POUCO CONHECIDO NO BRASIL. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

KADAM, S. R.; BESTEN, H.M.; 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. **International Journal of Food Microbiology**, 165, 259–264, 2013.

KNIGHT, G. C.; CRAVEN H. M. A model system for evaluating surface disinfection in dairy factory environments. **International Journal of Food Microbiology**. v.137, n.2-3, p.161–167, 2010.

LEISNER, J.J.; LUND, T.B.; FRANDSEN, E.A.; ANDERSEN, N.B.E.; FREDSLUND, L.; NGUYEN, V.P.T.; KRISTIANSEN, T. What consumers expect from food control and what they get - A case study of the microbial quality of sushi bars in Denmark. **Food Control**. v. 45, p.76-80, 2014.

PHILLIPS, C.A. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. **International Journal of Food Science and Technology**. Northampton, 2016.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

SEELINGER, H. P. R., JONES, D. Listeria. In: Sneath, H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p.1235–1245, 1986.

SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., & VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Lwt-food Science and Technology**, v. 43, p. 573 e 583, 2010.

WIRTANEN, G.; MATTILA-SANDHOLM, T. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless steel surface. **J. Food Prot.** v.56, p.678–683,2000.