

Área: Ciência dos Alimentos

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADESÃO DE *E. coli* E *L. monocytogenes* EM MICROPLACAS DE POLIESTIRENO

Juliana Barbosa; Valeska Grzybowski; Juliana Flach*; Rogério Luis Cansian; Mônica Cuppini; Geciane Toniazzo

Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional
Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, RS

*E-mail: juli_flach@yahoo.com.br

RESUMO – A avaliação da capacidade de adesão e formação de biofilme em microplacas é uma das técnicas mais utilizadas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de adesão de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em microplacas de poliestireno, utilizando coloração com cristal violeta e determinação da densidade óptica de cada cavidade. O teste indicou a ausência de aderência das bactérias com 2 horas de contato. Após 3 horas de contato *L. monocytogenes* começou a apresentar-se fracamente aderente, porém não consolidou a adesão após 6h de contato. Em 24h e 48 h, apresentou-se fracamente aderente, com adesão consolidada. Já, *E. coli* apresentou-se aderente após 6h de contato e conseguiu não apenas manter-se aderida, como também elevar o número de células nessa condição. *E. coli* demonstrou ser melhor formadora de biofilmes do que *L. monocytogenes* em monocultura.

Palavras-chave: Biofilme, *L. monocytogenes*, *E. coli*.

1 INTRODUÇÃO

O estudo de biofilmes microbianos recebeu significativa atenção ao longo das últimas décadas. Biofilme é definido como um conjunto de células microbianas está associado a uma superfície e encerrado em uma matriz extracelular, principalmente, por um suporte de polissacarídeo (Donlan, 2002). Os organismos associados e formadores de biofilme são fundamentalmente diferentes das populações de células em suspensão. Bactérias em biofilmes apresentam elevada resistência aos antibióticos, desinfetantes, etc. (Donlan, 2002).

Diversos métodos foram desenvolvidos para avaliação de aderência bacteriana e formação de biofilmes (Deighton, 2001), mas nenhum protocolo padronizado para avaliação da formação de biofilme bacteriano foi estabelecido até o momento. A quantificação de biofilmes teve início com um método baseado em cultivo de biofilme sobre a parede de um tubo de ensaio e detecção por reconhecimento de mancha de biofilme (Christensen, 1982). Posteriormente, os poços de microplacas foram usados como recipiente de cultura, e os

resultados foram medidos espectrofotometricamente (Christensen, 1985). Atualmente, diferentes métodos são utilizados, tais como tubo de ensaio, microplaca, marcação radioativa, microscopia, teste de placa de ágar Congo vermelho, etc. (Harraghy, 2006). No entanto, o método utilizando microplacas permanece entre os ensaios mais utilizados para a investigação de biofilme, e uma série de modificações têm sido desenvolvidas.

Um dos pontos críticos do processo de produção de alimentos é a higiene das operações que sempre foi alvo de verificações da Garantia de Qualidade e do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Equipamentos e utensílios com higienização inadequada participam isoladamente ou associados a outros fatores de surtos de doenças de origem microbiana veiculada. *Listeria monocytogenes* é um patógeno de origem alimentar que preocupa de forma significativa a indústria de alimentos (Wong, 2002), uma vez que é capaz de crescer a temperaturas de refrigeração (tão baixas quanto 1,5 °C) e em ambientes de atividade de água reduzida (Mena et al., 2004), em concentrações de até 30% e para valores de pH abaixo de 5,0 (Sofos e Bacon, 2003). Estas características contribuem para a sua sobrevivência sob condições normalmente utilizadas para controlar o crescimento de patógenos em alimentos. A *Escherichia coli* tem sua aplicação na indústria como indicadores das condições de higiene em processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha; ou quando há falha do controle de contaminação pós processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico, além de ser utilizada como indicador fecal em alimentos “in natura” (Kornacki e Johnson, 2001).

2 MATERIAL E MÉTODOS

No estudo de avaliação da adesão bacteriana foi utilizada a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e a Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922), da biblioteca de cepas do laboratório de Biotecnologia da URI Erechim.

Ensaio de adesão: a quantificação da capacidade de adesão e formação de biofilmes para as cepas de *L. monocytogenes* e *E. coli* utilizadas foi realizada conforme Stepanovic et al. (2000; 2007, com modificações), utilizando placas de poliestireno de fundo chato, com 96 cavidades.

As células foram suspensas em caldo Luria-Bertani (LB), com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mac Farland. Duzentos microlitros da suspensão foram aliquotados em octuplicata nas cavidades, sendo utilizadas placas diferentes para cada um dos tempos de contato a serem avaliados. O controle negativo foi realizado para cada uma das placas testadas e consistiu na octuplicata de cavidades contendo somente caldo LB estéril. Após, as placas foram tampadas e incubadas a 37 °C. Os tempos de contato das células com as microplacas foram: 5 min., 30 min., 1h, 2h, 3h, 6h, 24h e 48h. Após o período de incubação, o conteúdo das cavidades foi aspirado, e estas sofreram três lavagens sucessivas, utilizando 250 µL de solução salina estéril (0,85% de NaCl) para remoção de células não aderidas nas placas. Após, o material aderido foi fixado com 200 µL de metanol (99%) durante 15 min. Em seguida o metanol foi descartado e as placas secas ao ar. Após, 200 µL de cristal violeta de Hucker

(2%) foram adicionados por 5 min, sendo após lavados em água corrente para retirada de excesso de corante e seca naturalmente. O corante ligado às células aderentes foi re-solubilizado com 160 μL de ácido acético glacial (33% v/v). A leitura da densidade ótica (D.O.) de cada cavidade foi efetuada em leitor de microplacas (EL800 Biotek Instruments, INC.) com $\lambda = 490 \text{ nm}$.

A D.O. média das cavidades inoculadas com microrganismos foi calculada e comparada com o ponto de corte (DOc). O DOc representa o valor correspondente a três desvios-padrão acima da média da D.O. do controle negativo de cada placa. Foram considerados não aderentes os isolados com $\text{DO} \leq \text{DOc}$; fracamente aderentes os com $\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$; moderadamente aderentes os com $2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$ e fortemente aderentes os com $4 \times \text{DOc} < \text{DO}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A persistência de microrganismos em superfícies de processamento de alimentos é de fundamental importância já que a capacidade das cepas em aderir a superfícies e se manterem viáveis, permite a formação de biofilmes e, conseqüentemente, a contaminação dos alimentos produzidos (Moretro e Langsrud, 2004). Os resultados obtidos nessa etapa são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Quantificação da adesão de *E. coli* e *L. monocytogenes* em placas de poliestireno, considerando-se diferentes tempos de contato:

Microrganismo/Tempo	5 min	30 min	1 h	2 h	3 h	6 h	24 h	48 h
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA	NA	NA	NA	FA	MA	MA
<i>Listeria monocytogenes</i>	NA	NA	NA	NA	FA	NA	FA	FA

Legenda: NA: não aderente; FA: fracamente aderente; MA: moderadamente aderente.

Através dos dados da Tabela 1 é possível observar que até duas horas de contato as bactérias não são consideradas aderentes. Após 3 horas de contato *L. monocytogenes* começa apresentar-se fracamente aderente, possivelmente na fase de adesão reversível, em virtude de não consolidar a adesão após 6h de contato. Em 24h e 48 h, apresentou-se fracamente aderente, mas parece ter consolidado a adesão. Já, *E. coli* apresentou-se aderente após 6h de contato e conseguiu não apenas manter-se aderida, como também elevar o número de células nessa condição, demonstrando ser melhor formadora de biofilmes do que *L. monocytogenes* em monocultura. Esse resultado é corroborado por Stepanovic et al. (2004) uma vez que *L. monocytogenes* não é considerada boa colonizadora inicial de superfícies.

Uma possível explicação para a adesão menor de *L. monocytogenes* se deve à composição da superfície das células, matriz extremamente hidratada (Chavant et al., 2002). Essa característica pode ter influenciado a adesão da bactéria durante o período de incubação de 24 horas. Outra explicação é que houve aumento da hidrofobicidade das células que tornou a colonização do substrato hidrofóbico (poliestireno) difícil, uma vez que a

L. monocytogenes é fortemente hidrofílica durante as fases de crescimento. Stepanovic et al., (2004) mencionam que diversas estirpes de bactérias se aderem de forma diferente de acordo com as condições do meio de cultura, presença de nutrientes, e tipo de cepas. Takhistov e George (2004) apresentam resultados nos quais a *L. monocytogenes* apresenta biofilmes em direção a áreas com maior densidade de nutrientes, indicando ser este um fator determinante a sua adesão.

A *E. coli* possui uma série de fatores que justificam a adesão e o crescimento celular com o passar do tempo de contato com a superfície. Em bactérias Gram-negativas, tais como *E. coli*, a motilidade ativa é dependente de um aparelho flagelar que é necessário para sua movimentação. Em estudos realizados por Pratt e Kolter (1998), utilizando *E. coli* como um sistema modelo, metade dos mutantes que formaram biofilmes foram identificados com funções flagelares. Estes autores mostraram que a própria mobilidade, e não quimiotaxia ou superfície de contato direto por flagelos foi necessária para formar um biofilme, e que os flagelos além de permitir que as bactérias possam romper as forças repulsivas também permite que se espalhem ao longo da superfície. Combaret-Prigent et al. (2000) concluíram que a motilidade flagelar não é necessária para a adesão inicial, nem é necessário para o desenvolvimento do biofilme. Reisner et al. (2003) observaram que em uma estirpe de *E. coli* que carrega um plasmídeo conjugativo, conhecido como um forte fator de adesão (Ghigo, 2001), a presença de flagelo era dispensável para a formação de biofilme. Nestes casos, é possível que a expressão de fatores de adesão forte pode substituir movimentos geradores de força, durante as interações iniciais entre bactérias aderentes e a superfície (Pratt e Kolter, 1999; Geesey, 2001; Donlan, 2002).

4 CONCLUSÃO

Foi verificada a ausência de aderência das bactérias com 2 horas de contato. Após 3 horas de contato *L. monocytogenes* começa apresentar-se fracamente aderente, porém não consolida a adesão após 6h de contato. Em 24h e 48 h, apresentou-se fracamente aderente, com adesão consolidada. Já, *E. coli* apresentou-se aderente após 6h de contato e conseguiu não apenas manter-se aderida, como também elevar o número de células nessa condição,

A *E. coli* demonstrou ser melhor formadora de biofilmes do que *L. monocytogenes* em monocultura.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPERGS pela ajuda financeira e concessão de bolsas. A URI pela estrutura física.

6 REFERÊNCIAS

- ARCIOLA CR, CAMPOCCIA D, GAMBERINI S, CERVELLATI M, DONATI E, MONTANARO L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233–4239, 2002.
- CHAVANT P, MARTINIE B, MEYLHEUC T, BELLON-FONTAINE MN, HEBRAUD M. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 2, p. 728-737, 2002.
- CHRISTENSEN GD, SIMPSONWA, BISNO AL, BEACHEY EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infect Immun**, v. 37, p. 318–26, 1982.
- DEIGHTON MA, CAPSTICK J, DOMALEWSKI E, VAN NGUYEN T. Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. **Methods Enzymol**, v. 336, p. 177–179, 2001.
- DONLAN R M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, p. 881–890, 2002.
- DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, p. 167–93, 2002.
- DONLAN RM. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, p. 881–890, 2002.
- GEESEY G G. Bacterial behavior at surfaces. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, p. 296–300, 2001.
- GHIGO JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**, v. 412, p. 442–445, 2001.
- HARRAGHY N, SEILER S, JACOBS K, HANNIG M, MENGER MD, HERRMANN M. Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. **Int J Artif Organs**, v. 29, p. 368–378, 2006.
- KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA. p. 69-82, 2001.
- MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., HOGG, T. & GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v. 21, p. 213-216, 2004.
- MORETRO T, LANGSRUD S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments, **Biofilms**, v.1, p. 107-121, 2004.
- PRATT LA, KOLTER R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, p. 598-603, 1999.
- PRATT LA, KOLTER R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol Microbiol**, v..30, p. 285–293, 1998.
- PRIGENT-COMBARET C, PRENSIER G, LE THI TT, VIDAL O, LEJEUNE P, DOREL C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. **Environ Microbiol**, v. 2, p. 450–464, 2000.
- REISNER A, HAAGENSEN JA, SCHEMBRI MA, ZECHNER EL, MOLIN S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Mol Microbiol**, v. 48, p. 933–946, 2003.
- SOFOS, J.N. & BACON, R.T. Characteristics of biological hazards in foods. In: **Food Safety Handbook** (edited by R.H. Scchmidt & G.E. Rodrick). pp. 157–195, 2003.

STEPANOVIC S, CIRKOVIC I, RANIN L, SVABIC-VLAHOVIC M, Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, p. 428-32, 2004.

TAKHISTOV, P., GEORGE, B. “Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth”. **Bioproc Biosystems Eng**, v. 26, p. 259-270, 2004.

WONG, H.; CHUNG, Y.; YU, J. Attachment and inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. **Food Microbiol**, v. 19, p. 341-350, 2002.