

Área: Ciência de Alimentos

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA FORMAÇÃO DE CÉLULAS ADERENTES POR ISOLADOS DE *L. monocytogenes* DE DIFERENTES ORIGENS, SOROTIPOS E LINHAGENS

Marcia Magalhães Mata*, Louise Haubert, John P. Bowman, Wladimir Padilha da
Silva

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

*E-mail: marcinha.sul@gmail.com

RESUMO – *L. monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma doença severa de origem alimentar. Esse patógeno também é capaz de se aderir a uma grande variedade de superfícies do processamento de alimentos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da temperatura (4-10-25 e 37°C) e do tempo de incubação (24-48-168h) na capacidade de isolados de *L. monocytogenes* formarem células aderidas, levando-se em consideração diferentes origens, sorotipos e linhagens, utilizando-se o método colorimétrico em placas de microtitulação. Não há influência da origem dos isolados sobre a capacidade de *L. monocytogenes* formar células aderidas, entretanto, há influência dos sorotipos e das linhagens, com isolados da linhagem II e sorotipos 1/2a e 1/2b tendo capacidade de formar grande quantidade de células aderidas, quando comparadas aos demais, nas condições testadas neste estudo. Estes resultados indicam alto risco de contaminação e disseminação da listeriose, bem como a sobrevivência e persistência deste micro-organismo no ambiente.

Palavras-chave: Células aderidas. *L. monocytogenes*. Adesão celular. Biofilme.

1 INTRODUÇÃO

L. monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, uma doença severa de origem alimentar, que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, idosos, mulheres grávidas e recém-nascidos (RAMASWAMY et al., 2007; DONALDSON et al., 2009). Embora rara quando comparada com outras doenças de origem alimentar, a listeriose apresenta um alto percentual de letalidade (cerca de 30%), o que faz desse micro-organismo um importante patógeno humano (WATSON, 2009; ALLERBERGER & WAGNER, 2010).

L. monocytogenes exibe um alto nível de heterogeneidade entre uma cepa e outra, sendo que várias técnicas tem sido desenvolvidas ao longo dos anos para discriminar os isolados (CHEN & KNABEL, 2008). Entre os métodos fenotípicos, a sorotipagem é o mais utilizado e pode diferenciar 4 sorogrupos e 13 sorotipos, chamados 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e e 7 (SEELIGER & HOHNE, 1979; SEELIGER & JONES, 1996). O desenvolvimento de métodos baseados em ferramentas moleculares permitiu a identificação de quatro linhagens evolucionárias (I, II, III e IV) para essa espécie bacteriana. A maioria dos isolados desta bactéria pertence às linhagens I e II, sendo que os sorotipos mais comumente associados aos casos clínicos humanos são: sorotipo 1/2a (linhagem II) e sorotipos 1/2b e 4b (linhagem I). Cepas da linhagem II são encontradas em alimentos, no ambiente natural e da fazenda, e são também associados a casos de listeriose animal e casos esporádicos em humanos. Entretanto, a maioria dos casos de listeriose em humanos está associada a isolados da linhagem I (ORSI et al. 2011).

A formação de biofilmes permite a bactéria persistir no ambiente e resistir a diferentes tipos de estresses (BELESSI et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2010). A população bacteriana de *L. monocytogenes* encontrada em biofilmes pode atingir 10^4 – 10^7 CFU/cm² (GRAM et al., 2007). Atenção deve ser voltada para o fato de que *L. monocytogenes* não é capaz de formar densas camadas de biofilmes que podem chegar a 10^9 – 10^{12} CFU/cm² em outras espécies, então neste estudo ao invés de usar o termo “biofilme” nós vamos nos referir as células aderentes de *L. monocytogenes* como “células aderidas”. As células aderidas formadas por *L. monocytogenes* variam entre os isolados, mas as razões para essa variação continuam indeterminadas (BORUCKI et al., 2003; HARVEY et al., 2007). Sabe-se, entretanto, que o estresse ambiental influencia na adesão por *L. monocytogenes* (PAN et al., 2006; BEGLEY et al., 2009). Uma melhor compreensão dos fatores que contribuem para a variação na formação de células aderidas por cepas de *L. monocytogenes* pode levar ao aperfeiçoamento de medidas preventivas e minimizar os riscos causados pela formação de células aderidas por *L. monocytogenes* presente na indústria de alimentos.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da temperatura (4-10-25 e 37°C) e do tempo de incubação (24-48-168h) na formação de células aderidas de isolados de *L. monocytogenes* de diferentes origens, sorotipos e linhagens.

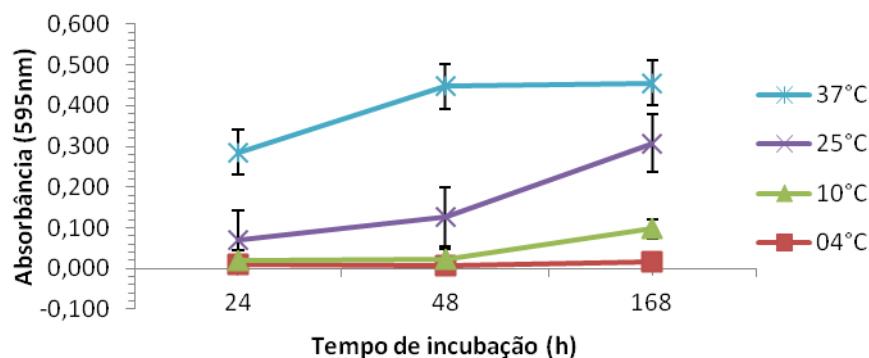
2 MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e um isolados de *L. monocytogenes* de diferentes linhagens (I e II), sorotipos (1/2a, 1/2b, 4b) e origens (indústria, animais, alimentos e casos clínicos) foram estudados. A formação de células aderidas para cada uma das quatro temperaturas (4-10-25 e 37°C) foram realizadas em triplicatas (3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas) para cada um dos 31 isolados de *L. monocytogenes* utilizando metodologia colorimétrica em placas de microtitulação descrita por Djordjevic et al. (2002) com modificações recomendadas por Borucki et al. (2003). A análise estatística foi realizada em programa Statistix e XLStat.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença significativa entre o tempo de incubação e temperaturas no processo de formação de células aderidas. Isso, como resultado provável de um grande desvio no perfil individual de cada isolado de *L. monocytogenes*, o que permite o diagnóstico de uma alta variabilidade inter-específica (Fig.1). Essa variabilidade inter-específica tem sido observada também em outros estudos (DI BONAVENTURA et al., 2008, PAN et al., 2009, NILSSON et al., 2011) e provavelmente tem sido causada pelos estímulos utilizados no experimento, que de certa forma interferiu na atividade metabólica das células aderidas em formação e, conseqüentemente, no perfil final da formação de células aderidas por cada isolado de *L. monocytogenes*.

Figura 1 – Adesão de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas e tempos de incubação. A média de três eventos independentes de todos os 31 isolados de *L. monocytogenes* estão mostradas.



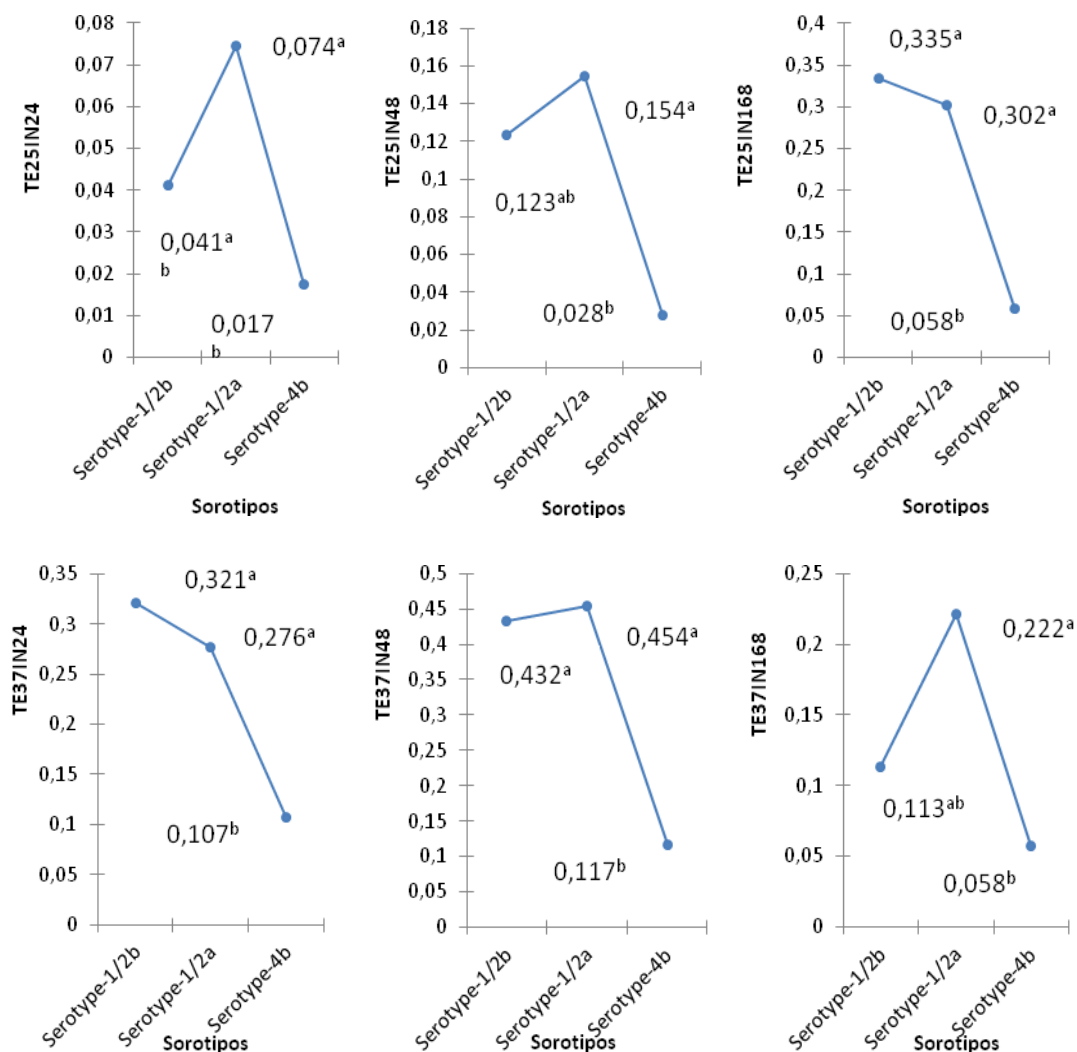
As variáveis de tempo e temperatura de incubação, quando submetidas ao teste de regressão logística não mostraram grau de significância estatística entre si. Entretanto, alguma variação foi observada nos mesmos períodos de incubação a 37°C. Em contraste, o coeficiente de correlação (R^2) a 4°C nos diferentes períodos de incubação foi mais alto quando comparados com os dados gerados a 37°C, provavelmente devido a menor variação entre os índices obtidos.

Quando a origem dos isolados foi analisada, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre elas e a formação de células aderidas, assim como entre os tempos e temperaturas de incubação e a origem. Entretanto, diferença estatística significativa foi observada quando comparamos a formação de células aderidas das duas linhagens de *L. monocytogenes* avaliadas (linhagens I e II). Os isolados da linhagem II produziram significativamente mais células aderidas do que aqueles pertencentes à linhagem I quando cultivados a 25°C e 37°C nos três diferentes tempos de incubação, assim como no experimento conduzido por Combrouse et al. (2013). Em contraste, Djordjevic et al. (2002) e Takahashi et al. (2009) observaram o oposto. Essas discrepâncias, comumente encontradas na literatura (BORUCKI et al. 2003; HARVEY et al. 2007; TAKAHASHI et al. 2009), talvez estejam relacionadas a diferenças nos desenhos experimentais e nos métodos utilizados para estudar biofilmes. Além disso, ambas cepas e condições de cultivo diferiram entre os estudos citados. Entretanto, todos concordam que os biofilmes de *L. monocytogenes* são

significativamente influenciados pela temperatura (MAI & CONNER 2007; DI BONAVENTURA et al. 2008), isolado (BORUCKI et al. 2003; TRESSE et al. 2006) e tempo de incubação (HARVEY et al. 2007).

Os resultados observados após análise da variável sorotipo mostrou diferença estatística significativa quando relacionado com a habilidade de adesão dos isolados de *L. monocytogenes* utilizados neste estudo. A 25°C e 37°C isolados do sorotipo 4b produziram muito menos células aderidas do que os demais isolados 1/2a e 1/2b (Fig. 2). Esses resultados estão de acordo com os experimentos conduzidos por Nilsson et al. (2011) e Di Bonaventura et al. (2008), mas diferem de Liu et al. (2006) que diz que a distribuição entre sorotipos e linhagens não deve ser considerada estritamente e absolutamente uma vez que existem sorotipos que são sub representados ou não representados.

Figura 2 – Análise das diferenças entre sorotipos a 25°C e 37°C nos tempos de incubação de 24h, 48h, 168h com intervalo de confiança de 95% (tukey – HSD).



4 CONCLUSÃO

Não há influência da origem dos isolados sobre a capacidade de *L. monocytogenes* formar células aderidas, entretanto, há influência dos sorotipos e das linhagens, com isolados da linhagem II e sorotipos 1/2a e 1/2b tendo capacidade de formar grande quantidade de células aderidas quando comparadas aos demais, nas condições testadas neste estudo.

5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o suporte da Indústria de Alimentos Nacional Australiana e Centros de excelência e Tasmania Instituto de Pesquisa Agrícola, CAPES, CNPq (Processo 482524/2010-3) e FAPERGS (Processo 11/1271-9).

6 REFERÊNCIAS

- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p. 16-23, 2010.
- BEGLEY, M.; KERR, C.; HILL, C. Exposure to bile influences biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Gut Pathog.**, v.1, p.11, 2009.
- BELESSI, C.E.A.; GOUNADAKI, A.S.; PSOMAS, A.N.; SKANDAMIS, P.N. Efficiency of diferente sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 145, p. 46-52, 2011.
- BORUCKI, M.K.; PEPPIN, J.D.; WHITE, D.; LOGE, F.; CALL, D.R. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p. 7336-7342, 2003.
- CHEN, Y.; KNABEL, S.J. Prophages in *Listeria monocytogenes* contain single-nucleotide polymorphisms that differentiate outbreak clones within epidemic clones. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p. 1478-1484, 2008.
- COMBROUSE, T.; SADOVSKAYA, I.; FAILLE, C.; KOL, O.; GU_ERARDEL, Y.; MIDELET-BOURDIN, G. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenic lineages with optimization of culture conditions. **J. Appl. Microbiol.**, v.114, p. 1120-1131, 2013.
- DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1552-1561, 2008.
- DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDBOROUGH, L. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2950-2958, 2002.
- DONALDSON, J. R.; NANDURI, B.; BURGESS, S.C.; LAWRENCE, M.L. Comparative Proteomic Analysis of *Listeria monocytogenes* Strains F2365 and EGD. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n.2, p. 366-373, 2009.

- GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y.Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B.F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Cont.**, v. 18, p. 1165-1171, 2007.
- HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiol.**, v.24, p.380-392, 2007.
- LIU, D.; LAWRENCE, M.; GORSKI, L.; MANDRELL, R.E.; AUSTIN, F.W.; AINSWORTH, A.J. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p. 204-207, 2006.
- MAI, T.L.; CONNER, D.E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 120, p.282-286, 2007.
- NILSON, R.E.; ROSS, T.; BOWMAN, J.P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 150, p.14-24, 2011.
- ORSI, R. H.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 301, p. 79-96, 2011.
- PAN, Y.; BREIDT, F.J.R.; KATHARIU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7711-7717, 2006.
- PAN, Y.; BREIDT, F.J.R.; KATHARIOU, S. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, p. 5846-5852, 2009.
- RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 4-13, 2007.
- SEELIGER, H.P.H.; HOHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. **Meth. Microbiol.**, v. 13, p. 31-49, 1979.
- SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H.A.; MAIR, N. S.; SHAPE, M. E. Bergey's **Man.Sist. Bacteriol.** 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, p. 1235-1245, 1996.
- TAKAHASHI, H.; MIYA, S.; IGARASHI, K.; SUDA, T.; KURAMOTO, S.; KIMURA, B. Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1476-1480, 2009.
- TAKAHASHI, H.; SUDA, T.; TANAKA, Y.; KIMURA, B. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 75, p. 618-625, 2010.
- TRESSE, O.;LEBRET, V.; BENEZECH, T.; FAILLE, C. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p. 53-62, 2006.
- WATSON, R. Deaths from listeriosis remain a cause for concern in Europe. **Brit. Med. J. (BMJ)**, v. 338, p. 258, 2009.