

Área: Ciência de Alimentos

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADERÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOX EM DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO

Tatiane Kuka Valente Gandra, Mariana Almeida Iglesias*, Isabela Schneid, Darla Silveira Volcan, Caroline Peixoto Bastos, Wladimir Padilha da Silva

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Laboratório de Microbiologia de Alimentos,
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

*E-mail: maryanaiglesias@hotmail.com

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de adesão de cinco isolados *L. monocytogenes*, provenientes de diferentes pontos de isolamento e/ou sorotipos em superfícies de aço inox considerando 8, 24 e 48h de contato. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tempos de incubação, entretanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o crescimento dos isolados sem prevalência de sorotipo ou de fonte de isolamento, além disso, todos os isolados de *L. monocytogenes* foram considerados formadores de biofilme nas superfícies dos cupons de aço inox, com concentrações médias variando de 3,95 a 7,71 LOGUFC.cm⁻². Assim, pode-se concluir que os isolados de *L. monocytogenes* analisados apresentam capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies de aço inox indiferentes da fonte, ou do sorotipo, ou tempo de incubação.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*, biofilme, aço inox.

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um micro-organismo ubíquo, Gram-positivo, não esporulado e intracelular facultativo que causa a listeriose, uma doença de origem alimentar atípica, cuja maior importância em saúde pública é sua severidade, com alta taxa de casos fatais, da ordem de 20-30% (GANDE & MURIANA, 2003; GILBRETH et al., 2005).

Este patógeno tolera altas concentrações de sal e valores de pH relativamente baixos, pode se multiplicar em temperaturas de refrigeração e apresenta a capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies tornando-se com isso uma das principais ameaças à segurança alimentar (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; UHITIL et al., 2004). Dessa forma, sua habilidade para sobreviver por longos períodos sob condições

ambientais adversas e para colonizar, se multiplicar e persistir em equipamentos de processamento faz desta espécie uma ameaça particular na indústria de alimentos (LUKINMAA et al., 2004).

Vários trabalhos demonstram que *L. monocytogenes* é capaz de se aderir e formar biofilme em superfícies de contato com os alimentos, como poliestireno, vidro e aço inoxidável. E esta formação de biofilme cria problemas à indústria alimentícia uma vez que representa uma importante fonte de contaminação dos alimentos (DI BONAVENTURA et al., 2008).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme de isolados de *L. monocytogenes* em cupons de aço inox considerando diferentes tempos de contato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Cinco isolados de *L. monocytogenes*, conforme a Tabela 1, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos - UFPel, provenientes de diferentes pontos de isolamento e/ou sorotipos, foram avaliados em triplicata quanto a formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável seguindo o protocolo proposto por Rieu et al. (2007) com adaptações.

Tabela 1 – Isolados de *L. monocytogenes* avaliados quanto a formação de biofilme em superfície de aço inox

Isolado	Sorotipo	Fonte de isolamento
LA003	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	Carcaça ovina
LA019	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	Massa embutido
LA016	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	Queijo colonial
LA035	<i>L. monocytogenes</i> 4e	Carcaça de frango
LA039	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a	Carcaça de frango

Nos cupons de 8cm de diâmetro, inseridos em placas de Petri e contendo TSB-YE 1% de glicose, foram inoculados os isolados de *L. monocytogenes* na concentração 0,5 de MacFarland (1/100) seguidos de cultivo a 37°C por 8h, 24h e 48h. Após este período o meio de cultivo foi retirado e os cupons foram lavados com 10mL PBS por duas vezes para a retirada das células fracamente aderidas e submetidos a secagem *overnight*.

As células aderidas foram retiradas através de esfregaço em superfície com o auxílio de *swabs* estéreis que foram inseridos em solução salina e homogeneizados em vortex por 1min. Para a enumeração das células aderidas foram realizadas diluições seriadas, seguidas de plaqueamento em duplicata em TSA-YE por 24h a 37°C.

As unidades formadoras de colônia (LOGUFC.cm⁻²) foram calculadas e os resultados submetido a ANOVA seguido do teste de média de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a capacidade de aderência em placas de aço inox não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tempos de incubação dos isolados, entretanto, foi observada diferença significativa ($p<0,05$) entre o crescimento dos isolados de *L. monocytogenes*, como pode ser observado nas Figura 1 e 2 respectivamente.

Figura 1 – Concentração média dos isolados de *L. monocytogenes* nos diferentes tempos de incubação em superfície de aço inox

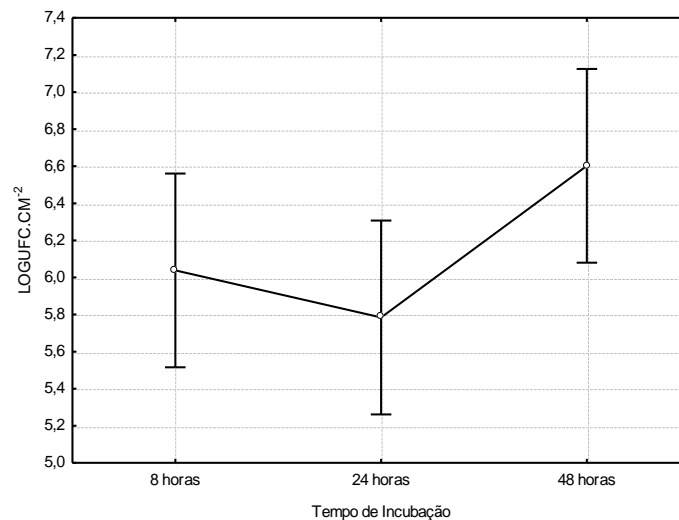
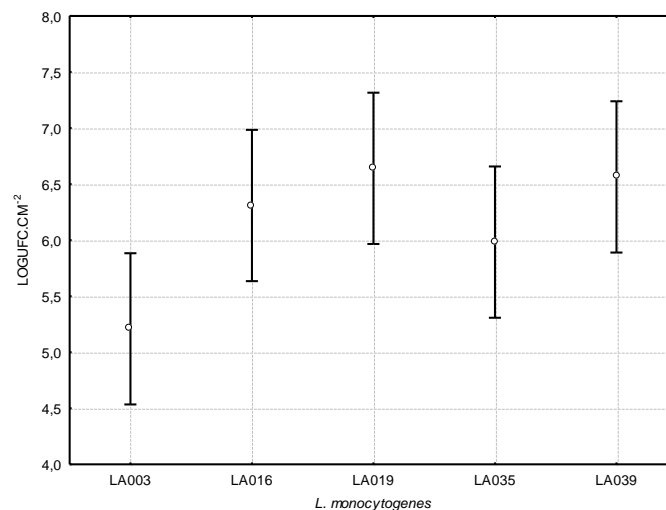


Figura 2 - Concentração média dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes de diferentes fontes e/ou sorotipos em superfícies de aço inox



O isolado LA003, correspondente a *L. monocytogenes* 1/2a proveniente de carcaça ovina, apresentou valores médios de crescimento significativamente menores ($p<0,05$) que o isolado LA019, correspondente a *L. monocytogenes* também de sorotipo 1/2a, isolada massa de embutido. Entre os demais

isolados não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Não havendo uma relação na aderência do cupom de inox entre os sorotipos ou a fonte de origem dos isolados analisados.

Utilizando os critérios propostos por Winkelströter (2008), onde é considerado formação de biofilme em aço inox concentrações bacterianas a partir de 3 LOGUFC.cm^{-2} , todos os isolados testados foram considerados formadores de biofilme, indiferente a fonte de isolamento, sorotipo ou ao tempo de incubação analisados.

Resultados semelhantes foram observados por Lourenço et al (2012) quando avaliaram a formação de biofilme de 30 isolados de *L. monocytogenes* e não observaram uma correlação significativa na capacidade de formação de biofilme entre diferentes sorotipos e linhagens, inclusive utilizando diferentes métodos de avaliação.

Travagin (2010) ao analisar adesão de *L. monocytogenes* em cupons de aço inox, tendo como substrato leite integral também encontrou valores médios próximos, entre 4,64 a $6,39 \text{ LOGUFC.cm}^{-2}$, entretanto, constatou diferenças significativas em relação ao tempo de adesão (6 a 12h), diferentemente no estudo em questão. Esta diferença provavelmente se deve às diferenças de substrato do leite integral em comparação ao meio TSB-YE utilizado nesta pesquisa.

Com base nestes resultados pode-se observar que não houve uma relação entre o sorotipo ou a origem dos isolados com a aderência em superfícies de aço inox, além disso, os tempos de incubação analisados não interferiram na formação de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes*. E dessa forma infere-se que a presença deste patógeno na indústria de alimentos é um grave problema, pois este micro-organismo pode tornar-se endêmico na planta de processamento através da aderência em superfícies e desta forma contaminar o produto final podendo causar graves prejuízos à saúde do consumidor.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os isolados de *L. monocytogenes* analisados apresentaram capacidade de formar biofilmes em superfícies de aço inox indiferentes da fonte ou do sorotipo, ou do tempo de incubação.

5 AGRADECIMENTOS

À FAPERGS (Processo 11/1271-9) e CNPq (Processo 482524/2010-3) pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

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. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-1561, 2008.

GANDE, N.; MURIANA, P. Prepackage surface pasteurization or ready-to-eat meats with a radiant heat oven for reduction of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1623-1630, 2003.

GILBRETH, S. E.; CALL, J. E.; WALLACE, F. M.; SCOTT, V. N.; CHEN, Y.; LUCHANSKY, J. D. Relatedness of *Listeria monocytogenes* Isolates Recovered from Selected Ready-To-Eat Foods and Listeriosis Patients in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8115-8122, 2005.

LOURENÇO, A. ; REGO, F. ; BRITO, L.; FRANK, J. F. Evaluation of Methods To Assess the Biofilm-Forming Ability of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1411–1417, 2012.

LUKINMAA, S.; AARNISALO, K.; SUIHKO, M. L.; SIITONEN, A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 10, n. 6, p. 563-568, 2004.

RIEU, A., WEIDMANN, S., GARMYN, D., PIVETEAU, P., GUZZO, J. agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role in adherence and differential expression pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6125-6133, 2007.

TRAVAGIN, B. N. F. S. **Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios**. 2010, 99f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZBERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

WINKELSTRÖTER, L. K. **Quantificação e análise de viabilidade de *Listeria monocytogenes* em biofilmes por semeadura em placa, microscopia de fluorescência e ensaios preliminares de PCR em tempo real**. 2008, 104f. Dissertação (Mestre em Biociências aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.