



ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BACTÉRIAS DE INTERESSE PARA INDÚSTRIA DE CARNES

Marcella B. **Ordonho**^{1a}; Renata **Bromberg**^{1b}; Míriam G. **Marquezini**^{1c}; Gláucia B.
Francelin^{1c}; Maria Isabel M. M. **Medeiros**^{2c}

¹ Instituto de Tecnologia de Alimentos, CTC; ² Instituto de Tecnologia de Alimentos, TecnoLat

Nº 13243

RESUMO

O biofilme consiste em um complexo ecossistema microbiológico que acarreta problemas de contaminação cruzada para a indústria de alimentos. As formas de controle de biofilmes em superfícies de contato com alimentos são por meio do uso de compostos sanitizantes, detergentes, ou agentes bioativos, como bacteriocinas. Neste trabalho avaliou-se a capacidade de produção de biofilme de cepas isoladas da indústria de carnes e a ação da nisina como agente inibidor. Os isolados foram coletados em um abatedouro de aves e em uma planta de processamento de produtos cárneos cozidos, perfazendo um total de 47 locais de coleta. Os isolados foram identificados e dentre estes, 17,1% das enterobactérias, 63,8% dos *Staphylococcus* spp. e 96,3% das *Listeria* spp. eram produtores de biofilme. A nisina apresentou potencial de inibição do biofilme produzido por 100% das culturas de enterobactérias e *Listeria* spp. e 87,5% dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Palavras-chaves: biofilme; indústria de carnes; enterobactérias; *Staphylococcus* spp.; *Listeria* spp.; bacteriocinas.

^a Bolsista CNPq; Graduação em Biomedicina; ^b Orientador, renatab@ital.sp.gov.br; ^c Colaborador.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT

Biofilm is a complex microbial ecosystem that causes problems of cross-contamination for the food industry. The control of biofilms in food contact surfaces are made by the use of compounds sanitizers, detergents, or bioactive agents such as bacteriocins. This study evaluated the ability to produce biofilm by strains isolated in the food industry and the inhibitory action of nisin. The strains were isolated in a poultry slaughterhouse and in a processing plant of cooked meat products, with a total of 83 sampling sites. The isolates were identified, and among them 17.1% of Enterobacteriaceae, 63.8% of *Staphylococcus* spp., and 96.3% of *Listeria* spp. were biofilm producers. Nisin had the potential of inhibit the biofilm produced by 100% of the cultures of Enterobacteriaceae and *Listeria* spp., and 87.5% of *Staphylococcus* spp.

Key-words: biofilm; meat industry; *Enterobacteriaceae*; *Staphylococcus* spp.; *Listeria* spp.; bacteriocins.

1. INTRODUÇÃO

O biofilme consiste em um complexo ecossistema microbiológico constituído por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies de bactérias, fungos e/ou protozoários, que se arranjam de modo isolado ou combinado (KYAW, 2012). Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e podem gerar problemas de saúde ou de ordem econômica temos: *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*. Os biofilmes ocasionam problemas de contaminação cruzada para a indústria de alimentos. Os riscos podem ser grandes, uma vez que as bactérias presentes no biofilme podem expressar um aumento da resistência aos desinfetantes à medida que os mesmos são repetidamente aplicados (PARIZZI *et al.*, 2004).

A eliminação das bactérias presentes no biofilme ainda é matéria de estudos. Uma forma alternativa de controle de biofilmes em superfícies de contato de alimentos é por meio do uso de compostos bioativos, como bacteriocinas. As bacteriocinas produzidas por algumas bactérias lácticas são peptídeos naturais, com ação antagonista contra outras bactérias. As bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas têm se mostrado eficientes na inibição de espécies de microrganismos de importância para a indústria de carnes como *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* spp. (BROMBERG *et al.*, 2005). As bacteriocinas podem apresentar ação antimicrobiana reduzindo o processo de colonização do biofilme em superfícies de contato com alimentos (BOWER *et al.*, 1995).



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras, isolamento e ativação das culturas

Para o isolamento de culturas de bactérias produtoras de biofilme foram realizadas quatro coletas de amostras ambientais sendo duas em um abatedouro de aves e duas em uma planta de produtos cárneos cozidos, localizados na região Sul do Brasil, em dois períodos distintos do ano. No total foram amostrados 47 locais das linhas de processamento distribuídos nas duas plantas.

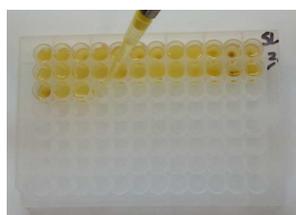
As amostras foram coletadas pela técnica de *swab*, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC). Os *swabs* foram ressuspensos em 25mL água peptonada tamponada (BPW) e submetidos às etapas de isolamento e identificação. Os métodos utilizados para a determinação dos microrganismos foram: *United States Department of Agriculture* (USDA, 2005) para *Listeria* spp., *American Public Health Association* (DOWNES & ITO, 2001) para *Staphylococcus* spp e ISO 6579 (2007) para *Salmonella* spp. A identificação final das cepas de *Salmonella* spp. não foi realizada, desta forma estas serão designadas neste trabalho como enterobactérias. As culturas isoladas de enterobactérias e *Staphylococcus* spp. foram ativadas a 35°C por 24h e as culturas de *Listeria* spp. a 30°C por 24h.

2.2. Formação de biofilme *in vitro*

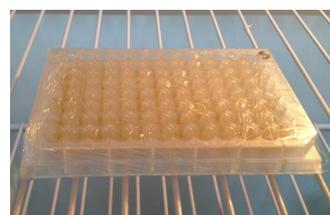
A partir das colônias isoladas, foram realizados testes de cultivo de biofilme. A metodologia de Cristal Violeta em placas de microtitulação de poliestireno foi empregada para a determinação da produção de biofilme *in vitro*, de acordo com STEPANOVIC *et al.* (2007) e FREITAS *et al.* (2010) com incubação a 35°C/72h e também testou-se a habilidade das culturas isoladas em produzir biofilme em temperatura de refrigeração a 7°C/15d (Figura 1). O ponto de corte (*cut-off*) correspondeu ao valor médio das absorbâncias do controle negativo somado a três desvios padrões.



a) Ativação das culturas isoladas.



b) Inoculação de 180µL de meio de cultura estéril e 20µL da cultura ativa em cada poço (em triplicata) na microplaca de poliestireno.



c) A microplaca foi embalada em filme de cloreto de polivinila (PVC) seguida de incubação.

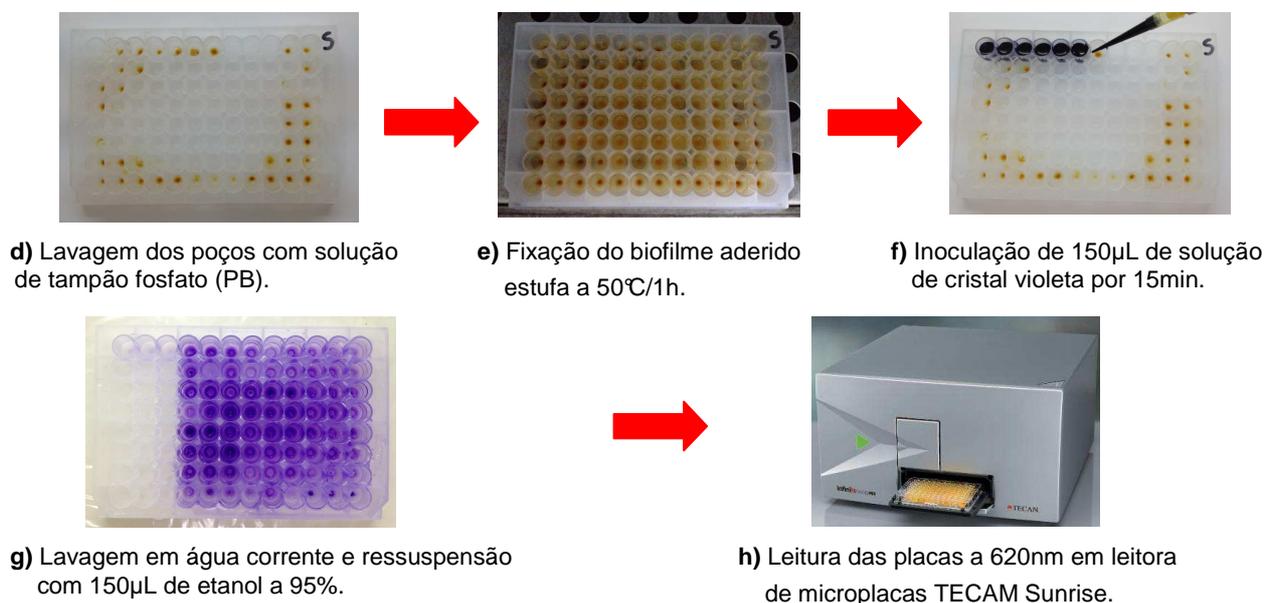


Figura 1. Procedimento para a formação de biofilme em microplacas.

2.3. Avaliação da produção de cápsula

A avaliação da capacidade das culturas isoladas em produzir cápsula como teste presuntivo para a formação de biofilme foi determinada pelo método de semeadura em ágar Vermelho Congo (AVC), adaptado de FREITAS *et al.* (2010). O meio de cultivo das enterobactérias foi o ágar Triptona de Soja (TSA), das culturas de *Listeria* spp. o ágar TSA suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura (YE) e, de *Staphylococcus* spp. o ágar BHI (Infusão de Cérebro e Coração), todos suplementado com 0,08% de Vermelho Congo.

2.4. Ação da nisina frente aos microrganismos isolados

A solução de nisina foi preparada a partir de um equivalente comercial (Nisaplan), com atividade de $3,7 \times 10^6$ UA, a qual foi diluída com HCl 0,02N até atividade de $1,2 \times 10^4$ UA. Para o teste com microrganismos gram negativos, foi adicionado EDTA 0,5M na solução de nisina até a atividade de $1,2 \times 10^4$ UA.

Foi inoculado 1mL de cada cultura ativa em placas de petri e aproximadamente 20mL de meio de cultura adequado (item 2.1) foram adicionados, seguindo-se de homogeneização das mesmas. Após a solidificação do meio de cultura foi realizada uma perfuração central neste, utilizando-se uma pipeta de *Pasteur* estéril. Foram adicionados 100µL da solução de nisina concentrada em cada orifício perfurado. As placas de ágar Triptona de Soja (TSA) para enterobactérias e ágar BHI para *Staphylococcus* spp. foram incubadas a 35°C/24h e de TSA+YE a



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

30°C/24h para *Listeria* spp. A leitura foi realizada verificando-se a presença ou não do halo de inibição ao redor dos poços contendo nisina (MONTIVILLE & WINKOWSKI, 1997).

A partir das culturas formadoras de biofilme, testou-se a ação da nisina sobre o biofilme já formado. Para cada amostra foram inoculados seis poços da microplaca com 180µL de meio de cultura e 20µL da cultura ativa. A microplaca foi envolta em filme de PVC e incubada a 35°C/24h. Após o período de incubação, foram adicionados 100µL de solução de nisina, preparada conforme descrito anteriormente, em três poços de cada amostra. As microplacas foram novamente embaladas em filme PVC e mantidas em temperatura ambiente durante 72h. Após o período de ação da nisina, as placas seguiram os procedimentos descritos nos itens E, F, G e H da Figura 1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Coleta das amostras e isolamento das culturas

Nas coletas realizadas foram isolados e identificados um total de 70 cepas de enterobactérias, 37 cepas de *Staphylococcus* spp. e 27 cepas de *Listeria* spp.

3.2. Avaliação da produção de biofilme

Das avaliações realizadas nos dois estabelecimentos quanto à produção de biofilme, as enterobactérias, os *Staphylococcus* spp. e as *Listeria* spp. apresentaram respectivamente 17,1%, 63,8% e 96,3% de culturas produtoras de biofilme (Tabelas 1 e 2).

No abatedouro de aves, as cepas de enterobactérias produtoras de biofilme foram detectadas nas áreas de depenagem, evisceração, escaldagem e pré-chiller, enquanto *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp foram isolados em todas as áreas da linha de processamento, exceto na área de embalagem. Na planta de produtos cárneos cozidos, as enterobactérias produtoras de biofilme estavam presentes nas áreas de embutimento, resfriamento, embalagem e fatiamento, os *Staphylococcus* spp. nas instalações dos processos de preparo da carne, moagem, trituração, embutimento, resfriamento, embalagem e fatiamento e, as *Listeria* spp. em todas as áreas, com exceção do cozimento, tingimento e embalagem.

3.3. Avaliação da produção de cápsula e inibição por nisina

A capacidade da formação de cápsula foi verificada em 96,3% das *Listeria* spp., 75% dos *Staphylococcus* spp. e 22,8% das enterobactérias (dados não apresentados). Das culturas testadas, 100% das enterobactérias e *Listeria* spp. e 87,5% dos *Staphylococcus* spp. apresentaram sensibilidade frente a nisina na concentração de $1,2 \times 10^4$ UA (Tabelas 1 e 2).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 1. Distribuição das bactérias produtoras de biofilme e ação inibitória da nisina no abatedouro de aves.

Área	Local	Nº de Enterobactérias			Nº de <i>Staphylococcus</i> spp.			Nº de <i>Listeria</i> spp.		
		35°C/72h	7°C/15d	Nisina*	35°C/72h	7°C/15d	Nisina*	35°C/72h	7°C/15d	Nisina*
Recepção	Gaiolas	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Ralo	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Nória	-	-	-	1	1	S	1	1	S
Sangria	Lavador de botas	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Nória	-	-	-	1	1	S	-	-	-
	Túnel de sangria	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Disco de corte	-	-	-	1	1	S	-	-	-
Depenagem	Penas	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Dedos depenadeira	-	-	-	-	-	-	1	1	S
	Disco pés	1	1	S	-	-	-	1	1	S
	Disco cortador de cabeça	-	-	-	1	1	S	-	-	-
	Água insensibilizador	-	-	-	1	1	S	-	-	-
Evisceração	Serra de corte abdominal	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Esteira	1	1	S	1	1	S	1	1	S
	Abridor de moela	1	1	S	-	-	-	1	1	S
	Ralo	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Extrator da cloaca	-	-	-	1	1	S	-	-	-
Escaldagem	Água	1	1	S	1	1	R	-	-	-
Pré-chiller	Água	1	1	S	1	1	S	1	1	S
Chiller	Água	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Calha gotejamento	-	-	-	1	1	S	1	1	S
Embalagem	Esteiras	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ralo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* = Produção de biofilme em 24h na temperatura de 35°C com adição de nisina por 72h; R = Resistente; S = Sensível; - não produtor de biofilme.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 2. Distribuição das bactérias produtoras de biofilme e ação inibitória da nisina na planta de processamento de produtos cárneos cozidos.

Área	Local	Nº de Enterobactérias			Nº de <i>Staphylococcus</i> spp.			Nº de <i>Listeria</i> spp.		
		35°C/72h	7°C/15d	Nisina*	35°C/72h	7°C/15d	Nisina*	35°C/72h	7°C/15d	Nisina*
Preparo da Carne	Bancada	1	1	S	-	-	-	1	1	S
	Faca	-	-	-	-	-	-	1	1	S
	Balança	-	-	-	1	1	S	1	1	S
Moagem	Moedor	-	-	-	1	1	R	1	1	S
Trituração	Cutter	-	-	-	1	1	S	-	-	-
	Tumbler	-	-	-	1	1	S	1	1	S
	Ralo	-	-	-	1	1	S	1	1	S
Embutimento	Tripa	1	1	S	1	1	S	-	-	-
	Ralo	1	1	S	-	-	-	1	1	S
Cozimento	Bancada	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Formas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resfriamento	Chuveiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Água do chuveiro	-	-	-	-	-	-	1	1	S
	Ralo	1	1	S	1	1	R	1	1	S
Tingimento	Túnel de descascamento	-	-	-	1	1	R	-	-	-
Fatiamento	Ralo	-	-	-	1	1	S	-	-	-
	Mesa	-	-	-	-	-	-	1	1	S
	Esteira	1	1	S	1	1	S	-	-	-
Embalagem	Embalagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mesas	-	-	-	1	1	S	-	-	-
	Esteira	1	1	S	1	1	S	1	1	S
	Esteira transportadora	1	1	S	1	1	S	-	-	-
	Faca	-	-	-	1	1	S	-	-	-
	Bancada	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* = Produção de biofilme em 24h na temperatura de 35°C com adição de nisina por 72h; R = Resistente; S = Sensível; - não produtor de biofilme.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

4. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais desenvolvidas neste estudo, foi observada a formação de biofilme por enterobactérias, *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. no abatedouro de aves e na planta de produtos cárneos cozidos avaliados. Houve boa concordância entre os métodos do AVC e da produção de biofilme em microplaca a 7°C e 35°C. O método do AVC utilizado para uma avaliação indireta da produção de biofilme mostrou-se sensível e poderia ser utilizado para demonstrar as características presuntivas de um microrganismo na formação de biofilme. A nisina atuou como agente inibitório na formação de biofilme inclusive no grupo de bactérias gram negativas testado.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bower, C.K.; Mcgure, J.; Deschel, M.A. Influence on the antimicrobial activity of surface adsorbed nisin. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, p.227-233, 1995.

Bromberg, R.; Moreno, I.; Delboni, R.R.; Cintra, H.C.; Oliveira, P.T.V. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.351-358, 2005.

Downes, F.P.; Ito, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2001.

Freitas, V.R.; Sand, S.T. van der; Simonetti, A.B. Formação *in vitro* de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.39, n^o4, p.193-200, 2010.

ISO 6597. Microbiology of food animal feeding stuffs - **Horizontal method for the detection of *Salmonella* sp.**, 2007.

Kyaw, C.M. **Biofilmes Microbianos**. Disponível em <www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm>. Acesso em 12 de outubro de 2012.

Montville, T.J.; Winkowsky, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R.; Montville, T.J., ed. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, p. 557-577, 1997.

Parizzi, S.Q.F.; Andrade, N.J.; Silva, C.A.S.; Soares, N.F.F.; Silva, E.A.M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.47, n.1, p.77-83, 2004.

Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Boaventura, G.D.; Djukic, S.; Cirkovic, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.115, p.891-9. 2007.

USDA/FSIS. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. In: United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS), **Microbiology Laboratory Guidebook**. Cap. 8.04, revised September 2005.