

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Juliana Sousa Bogéa

Ação in vitro de bactérias ácido lácticas frente a *Listeria*
***monocytogenes* formadora de biofilmes**

Passo Fundo
2020

Juliana Sousa Bogéa
Tecnóloga em Alimentos

Ação in vitro de bactérias ácido lácticas frente a *Listeria monocytogenes* formadora de biofilmes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades funcionais de alimentos.

Orientador: Dra^a Luciana Ruschel dos Santos

Passo Fundo
2020

CIP – Catalogação na Publicação

B674a Bogéa, Juliana Sousa

Ação *in vitro* de bactérias ácido lácticas frente a *Listeria monocytogenes* formadora de biofilmes / Juliana Sousa Bogéa. – 2020.

56 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Luciana Ruschel dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) – Universidade de Passo Fundo, 2020.

Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva –

CRB 10/2241

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

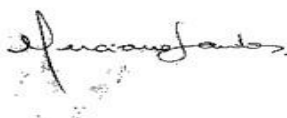
Ação *in vitro* de bactérias ácido láticas frente a *Listeria monocytogenes* formadora de biofilmes

Elaborada por

JULIANA SOUSA BOGEA

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA



**Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)**



Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF



ANDREA TROLLER PINTO, DRA., UFRGS

Passo Fundo, RS, Brasil 2020

Dedico este trabalho à Deus, a minha vó Deusimar, e aos meus amados pais: Ivonete e Jailton Bogéa.

Tudo posso naquele que me fortalece!

Filipenses 4:13.

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e meu caminho ao propósito da realização desse trabalho.

À minha família pelo apoio e incentivo durante todos os momentos. Principalmente, minha vó Deusimar, meus pais Ivonete e Jailton, e aos meus irmãos Francisco, Denise, Dayse e Jailton Filho, pela cumplicidade, paciência para me auxiliar no que fosse possível durante a elaboração deste trabalho. Amo muito vocês!

À minha Família Bogéa no qual sempre me deram apoio e acreditaram no meu potencial, mesmo distante.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Luciana Ruschel Dos Santos pela amizade, oportunidade concedida e pelo aprendizado no qual fez eu superar as adversidades.

À minha Prof^a. Dr^a Daniela Brito por toda força, carinho e incentivo para realização do mestrado.

À minha colega Luciane Manto pela ajuda no necessário e pela amizade.

A minha amiga Aline Passos por estar presente comigo desde 2013, por nossa amizade construída em longo desse tempo me dando força, atenção, amor, carinho, puxões de orelha e ajuda no necessário. Não é em vão estarmos juntas até no mestrado.

As amigas Eduarda Rocha, Fernanda Pinto e Leila Lopes por amizade, companheirismo, ajuda e incentivo.

Aos amigos e colegas de pesquisa Lucas e Enzo Mistura pelos bons momentos de convivência e ajuda nas dificuldades para concretização deste trabalho, sem vocês não teria conseguido.

Aos amigos e colegas de mestrado Jonatan Mello, Rodrigo Carli e Lariane Strack no qual também se tornaram família, compartilhamos vários momentos juntos.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo (UPF) pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

À todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica causadora de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA), amplamente distribuída no ambiente e que pode sobreviver em instalações de processamento de alimentos por meses ou anos. Mesmo após os procedimentos de limpeza e higienização, a bactéria pode permanecer nos ambientes de processamento de alimentos tanto na forma séssil como em biofilmes, contaminando alimentos e superfícies. O controle e remoção de biofilmes são dificultados pela adesão às superfícies bem como ao crescente padrão de resistência destes aos sanitizantes comumente utilizados da indústria. As bactérias ácido lácticas (BALs) podem inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos em alimentos e seriam uma alternativa de controle de biofilmes nas superfícies de contato. Assim, neste trabalho avaliou-se a ação de cinco BALs na inibição e/ou remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* previamente identificada como fortemente aderente. As bactérias utilizadas foram *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivaris* e *L. acidophilus*, testadas nos ensaios de testes de Agar Difusão. Destes ensaios preliminares identificou-se que *B. animalis* e *L. plantarum* mostraram ação sobre *L. monocytogenes*, sendo então selecionadas para os ensaios de formação de biofilmes em microplacas em temperaturas de 30 °C e 37°C. As BAL's e as Listerias foram eficazes em formação do biofilme individualmente, porém não mostraram diferença significativas estatisticamente nas temperaturas de 30 °C e 37 °C. A redução de biomassa de biofilme em desenvolvimento da produção de *L. Plantarum* e *B. Animalis* contra *L. monocytogenes* ATCC e L4 quando avaliado por contagem de células pelo UFC método de *drop plate*, observou-se que não foi totalmente eficiente para reduzir uma grande camada de biofilme de Listeria, não atingindo a redução de 5 Log. No geral as BAL's podem oferecer melhorias significativas na segurança dos alimentos, mas requer outras estratégias alternativas adotadas para formação e inibição de biofilmes contra *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*. Bactérias ácido lácticas. Biofilmes.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogenic bacterium that causes Foodborne Diseases (DVA), widely distributed in the environment and that can survive in food processing facilities for months or years. Even after cleaning and sanitizing procedures, the bacteria can remain in food processing environments both in sessile form and in biofilms, contaminated food and surfaces. The control and removal of biofilms are hampered by adhesion to surfaces as well as their increasing resistance to the commonly used sanitizers in the industry. Lactic acid bacteria (BALs) can inhibit or delay the multiplication of microorganisms in food and would be an alternative to control biofilms on contact surfaces. Thus, this work evaluated the action of five BALs in inhibiting and / or removing biofilms from *L. monocytogenes* previously identified as strongly adherent. The bacteria used were *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivaris* and *L. acidophilus*, tested in the Agar Diffusion tests. From these preliminary tests it was identified that *B. animalis* and *L. plantarum* showed action on *L. monocytogenes*, being then selected for the biofilm formation tests in microplates at temperatures of 30 ° C and 37 ° C. The BAL's and *Listerias* were effective in forming the biofilm individually, however they did not show statistically significant difference in the temperatures of 30 ° C and 37 ° C. The reduction of biofilm biomass in development of the production of *L. Plantarum* and *B. Animalis* against *L. monocytogenes* ATCC and L4 when evaluated by cell count using the UFC drop plate method, it was observed that it was not fully efficient to reduce a large *Listeria* biofilm layer, not reaching the 5 Log reduction. In general, BALs can offer significant improvements in food safety, but require other alternative strategies adopted for the formation and inhibition of biofilms against *L. monocytogenes*.

Keywords: *L. monocytogenes*; lactic acid bacteria; biofilms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA no Brasil de 2003 a 2018	17
Figura 2- Modelo esquemático das fases da formação de biofilme.....	19
Figura 3 - Fluxograma das etapas de execução deste trabalho	23
Figura 4 – Fórmula da porcentagem de inibição e competição de adesão de <i>Listeria</i> ATCC e L4	27
Figura 5– Média da densidade optica da competição das <i>Listerias</i> e BAL's nos tratamentos de 30 °C e 37 °C	29
Figura 6– Média da densidade optica de inibição das <i>Listerias</i> e BAL's nos tratamentos de 30 °C e 37	30
Figura 7- Procedimento de contagem pelo método de drop plate. (A) BAL, (B) <i>L. monocytogenes</i>	31
Figura 8– Quantificação em log ₁₀ UFC ml ⁻² em diferentes temperaturas quanto a formação de biofilme em inibição	31
Figura 9– Quantificação em log ₁₀ UFC ml ⁻² em diferentes temperaturas quanto a formação de biofilme em competição	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média de halos de inibição (mm) das BALs frente a <i>L. monocytogenes</i> L4 e ATCC 7644	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C: graus

μL: microlitros

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI: Caldo Brain-Heart Infusion

DO: densidade óptica

DVA: DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTO

FAMV: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

G: gramas

h: horas

ISO: International Organization for Standardization

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL: mililitro

NARMS: National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria

OMS: Organização Mundial da Saúde

RDC: Resolução

LM: *Listeria Monocytogenes*

L4: *Listeria Monocytogenes* L4 Laura

MRS: Ágar De Man, Rogosa e Sharpe

BHI: Brain Heart Infusion

PALCAM: PALCAM *Listeria* Agar

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UPF: Universidade de Passo Fundo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Bactérias do gênero <i>Listeria</i> spp.....	15
2.1.1 Características	15
2.1.2 <i>Listeria</i> spp. e saúde pública	16
2.2 Biofilmes	18
2.2.1 Biofilmes e a indústria de alimentos	19
2.3 Bactérias ácido lácticas (bals).....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Cepas de bactérias ácido lácticas	23
3.2 Cepas de <i>L. monocytogenes</i>.....	23
3.3 Preparação do sobrenadante livre de células – bal’s	24
3.4 Teste das bal’s contra <i>L. monocytogenes</i> pelo método de ágar difusão.....	24
3.5 Ensaio de formação de biofilmes em placas de poliestireno.....	25
3.5.1 Adesão bacteriana de bactérias ácido lácticas	25
3.5.2 Inibição e competição da adesão de <i>L. monocytogenes</i> por bactérias ácido lácticas.....	26
3.6 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Ágar difusão	28
4.2 Competição e inibição de adesão de listeria por bal’s.....	29
4.3 Contagem de células	30
5 CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE – ARTIGO PARA SUBMISSÃO	41

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é reconhecida como um microrganismo de importância tanto para saúde pública quanto para a indústria de alimentos, devido sua patogenicidade e capacidade de sobrevivência em diversas condições ambientais e alimentos prontos para consumo (RODRÍGUEZ, 2017). A *L. monocytogenes* é um dos principais micro-organismos patogênicos que oferecem risco a saúde do consumidor ao provocar Doenças Veiculadas por Alimentos - DVAs (COSTA, 2008).

A garantia da inocuidade de um alimento depende de fatores como higiene na produção, contaminação cruzada, processamento e armazenamento inadequados, equipamentos contaminados e manipuladores, bem como aplicação incorreta das Boas Práticas de Fabricação (BPF). A persistência de *L. monocytogenes* nas superfícies pode ser influenciada por propriedades específicas de cada cepa, como na capacidade de aderência ao aço inoxidável e susceptibilidade aos desinfetantes, que influenciam diretamente na formação de biofilmes (CEZAR et al., 2013; DIAS, 2008).

Na forma de biofilmes os microrganismos apresentam maior resistência aos agentes de limpeza e sanitização, o que dificulta ou inviabiliza os processos de sanitização, uma vez que quando aderidos às superfícies de contato com alimento podem não ser completamente removidos e se desprender destas superfícies, contaminando os alimentos e mantendo a contaminação ambiental (OLIVEIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2014; BUCHANAN et al., 2017; CAMARGO et al., 2018). Esta resistência das bactérias quando na forma de biofilmes representa um desafio para o controle de *L. monocytogenes* nas indústrias, o que tem levado a pesquisas com métodos alternativos de diminuição ou eliminação do microrganismo.

As bactérias ácido lácticas (BALs) tem alta ocorrência na natureza e não apresentariam riscos à saúde pública, situam-se dentre as alternativas consideradas promissoras para prevenção da resistência a antimicrobianos com. As BALs já vem sendo aplicadas em alimentos como uma das formas de controle de DVAs (ANDERSON et. al., 2018) e poderiam também ser usadas como biocontrole em superfícies de contato com alimentos.

Assim, considerando a necessidade de redução de antimicrobianos e substâncias químicas no processamento de alimentos, neste estudo avaliou-se a capacidade das BALs na inibição ou competição da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em microplacas de polietileno.

O presente projeto se enquadra na linha de pesquisa “Qualidade e Propriedades Funcionais de Alimentos” e projeto 1, denominado “Avaliação e controle de qualidade de alimentos”.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias do gênero *Listeria* spp.

2.1.1 Características

As bactérias do gênero *Listeria* estão amplamente disseminadas na natureza. São anaeróbias facultativas e tem a tendência a se dispor em paliçada, fato evidenciado em esfregaços comuns observados em microscópio óptico (PICHI et al., 1999). O gênero tem 22 espécies, dentre os quais alguns agentes patogênicos como: *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*. Embora *L. ivanovii* pareça ser rara e causa doença em ruminantes, *L. monocytogenes* representa as espécies de *Listeria* mais comumente associada a doenças tanto em animais quanto em seres humanos (ORSI; BAKKER; WIEDMANN, 2011).

É um micro-organismo psicotrópico, na forma de bastonetes gram-positivos pequenos, extremidades arredondadas e também cocoide e ou filamentosa, em culturas com 2-3 dias. Não formadores de esporos e de cápsula, anaeróbios facultativos e móveis a 30°C, devido à presença de flagelos peritríquios. Por ser um micro-organismo ubíquo, o solo é um nicho crucial para sua persistência e transmissão para plantas e animais, favorecendo assim a contaminação de alimentos ((FARBER; PETERKIN, 1991; PHAN-THANH et al., 2000; LOVETT, 1989) VIVANT et al., 2013).

Diversos fatores podem afetar a multiplicação de *Listeria* e a relativa resistência térmica e capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração é um destaque do gênero. São afetados por temperatura, pH, atividade de água, cloreto de sódio, nitrito de sódio, conservantes e atmosfera (KASNOWSKI, 2004). Pode ser multiplicar em pH amplo (4.7-9.2), altas concentrações de sal (10-12 %, suportando até 25%) baixas temperaturas (-0,4 a 50 °C). A temperatura ótima de multiplicação situa-se entre 30-37 °C e atividade água ótima de >0,97, com a mínima variando entre 0,90 - 0,93 (LIU, 2006; HARTMANN et al., 2009).

Um fator importante na relação com a presença desta bactéria é sua resistência a diversas condições ambientais, maior do que de muito outros patógenos não esporuladores transmitidos por alimentos, o que possibilita sua sobrevivência durante mais tempo e em condições adversas, como congelamento, secagem e salga (POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

Está presente nos solos, silagem, efluentes de esgoto, cursos d'água e de maneira secundária em mais de 50 espécies de animais, incluindo ruminantes, suínos, equinos, cães, gatos, e várias espécies de aves. *L. monocytogenes* é a espécie denominada como patogênica, causando a listeriose alimentar (GOMES, 2015).

Diversos tipos de alimentos foram relacionados à contaminação por *L. monocytogenes*, dentre eles vegetais, leite e derivados, carnes e produtos prontos para consumo, podendo a sua contaminação ocorrer nas etapas de produção, armazenamento, transporte ou pelo consumidor final (ROCOURT, 1999; CARRASCOSA et al., 2016).

2.1.2 *Listeria spp.* e saúde pública

No início da década de 1980 o aumento da ocorrência de surtos de listeriose nos EUA e Europa demonstraram tratar-se de uma doença de grande importância para a saúde pública, deixando de ser considerada apenas doença que acomete animais (VASQUEZBOLAND et al., 2001; HOF, 2003).

No início da infecção, a listeriose assemelha-se a um resfriado comum, acompanhado de febre, dores musculares e distúrbios gastrointestinais. Quando a infecção atinge o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como dor de cabeça, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A listeriose apresenta como principal grupo de risco gestantes, recém nascidos, imunocomprometidos e idosos, por serem os mais suscetíveis a formas invasivas da doença (OXARAN et al., 2017; WIECZOREK e OSEK, 2017).

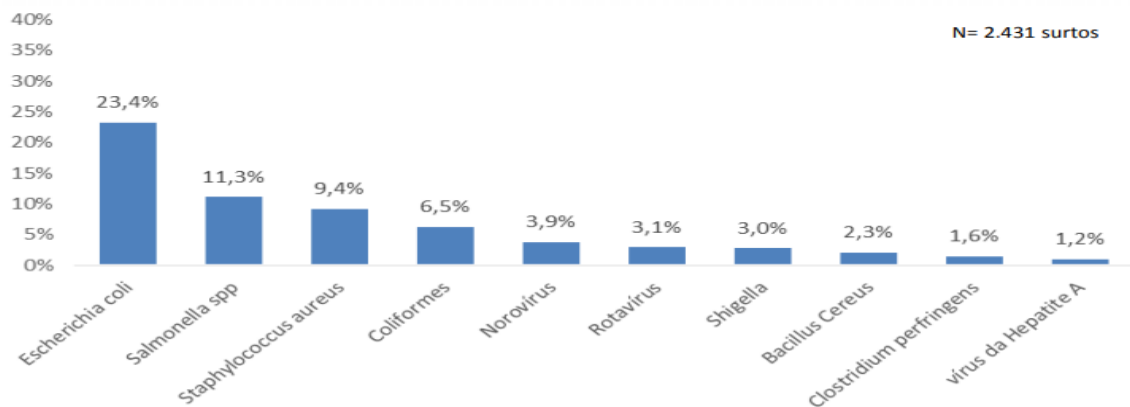
Um caso recente da contaminação de alimentos por *L. monocytogenes* ocorreu na cidade de Porto Alegre em agosto de 2017 em fatiados da rede Zaffari, levando a interdição da unidade de fatiamento do Bourbon Ipiranga, local onde foi encontrado o microrganismo em uma peça de queijo (MATOS, 2017).

Além disto, pode ser encontrado na literatura trabalhos como o de Ristori e colaboradores (2014) que aponta uma preocupante taxa de contaminação por *Listeria spp.* (85%) do total das 552 amostras de alimentos cárneos em São Paulo, sendo que em 48,7% (269/552) havia a presença de *L. monocytogenes*.

A bactéria foi encontrada em uma variedade de alimentos crus, carnes mal cozidas e legumes, bem como em alimentos industrializados que se contaminaram durante ou após o processamento, como queijos moles e frios (CDC, 2009).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2019), dentre os agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA nos anos de 2003 a 2018 estão as bactérias, porém, não há dados relacionados à *L. monocytogenes*, como pode-se observar na Figura 1.

Figura 1- Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA no Brasil de 2003 a 2018



Fonte: Ministério da saúde (2019).

Por muitos anos a epidemiologia da listeriose foi uma incógnita e os isolados da bactéria em laboratórios não passavam de poucos achados, sem grande importância. O fato de muitos casos de DTA não serem notificados e investigados pode mascarar a real ocorrência das doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2017).

Andrade (2018), pesquisou a presença de *L. monocytogenes* em presuntos fatiados obtidos em supermercados da cidade do Recife-PE, e identificou o microrganismo em 25% (10/40) do total de amostras analisadas.

L. monocytogenes é frequentemente exposta a diversos agentes durante o processamento de alimentos ou procedimentos de limpeza e desinfecção e os efeitos de tais estresses ambientais podem influenciar sua resposta e capacidade de persistir nesses ambientes (MAGALHÃES et al., 2016).

As propriedades de *L. monocytogenes* que fazem ser persistente ou não persistente em um ambiente de processamento de alimentos não são bem compreendidos. Tem sido sugerido que a persistência está relacionada à habilidade das cepas em formar biofilmes e sobreviver a tratamentos sanitizantes (HOLAH et al., 2002).

Bolocan e colaboradores (2017), investigaram a capacidade de ocorrência natural de bactérias isoladas do substrato de cogumelos para prevenir a formação de biofilme por *L. monocytogenes* ou para remover biofilmes existentes em instalações de produção de cogumelos e seus resultados mostraram que as cepas produtoras de bacteriocinas podem prevenir a formação de biofilme e reduzir biofilmes pré-formados de *L. monocytogenes*.

2.2 Biofilmes

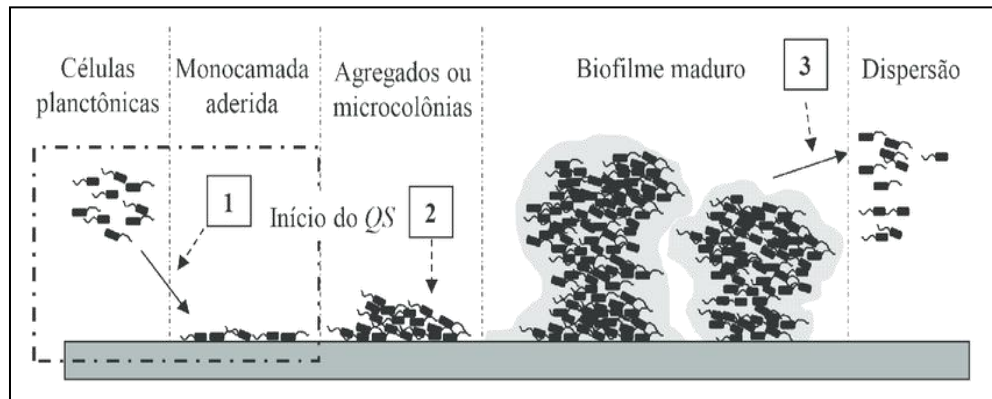
Os biofilmes são grupos bacterianos, constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), produzida de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, aderidas a um substrato biótico ou abiótico, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN & COSTERTON, 2002; FLEMMING *et al.*, 2016). Existe a possibilidade de a superfície de adesão ser de caráter biótica ou abiótica (GUPTA, 2015).

Existem na literatura descrições diferentes de estrutura dos biofilmes. Pelo menos três tipos de estruturas diferentes foram publicadas até o momento: a estrutura tradicional do biofilme (estrutura plana e homogênea); o modelo homogêneo em mosaico (constituída por micro colônias de bactérias unidas por EPS rodeadas por uma fase líquida); e a forma em cogumelo (estrutura de biofilme semelhante a um cogumelo com vários canais através dos quais passa a fase líquida), sendo essa última a mais citada (BEER *et al.*, 1994; COSTERTON *et al.*, 1995).

A formação do biofilme é um processo dinâmico que engloba várias etapas: 1) pré-condicionamento da superfície por macromoléculas presentes no ambiente; 2) transporte de células planctônicas do meio circundante à superfície; 3) adesão inicial em uma superfície biótica ou abiótica; 4) migração de células formando micro colônias, com sinalização molecular - sistema *quorum sensing*; 5) produção da matriz exopolimérica; 6) maturação e desenvolvimento, com internalização de nutrientes, metabolismo dos mesmos e transporte de resíduos, e; 7) liberação de células planctônicas e agregados bacterianos das camadas mais externas, para subsequente dispersão, multiplicação e colonização de novas superfícies, assim, estabelecendo um equilíbrio dinâmico do biofilme (COSTERTON, 1999; SIMÕES; BENNETTB; ROSAB, 2009).

A formação do biofilme ocorre conforme as etapas apresentadas na Figura 2: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes: adesão reversível, a adesão irreversível, formação de estruturas com formato típico de cogumelos e a ruptura dos biofilmes (TRETIN *et al.*, 2013).

Figura 2- Modelo esquemático das fases da formação de biofilme



Fonte: Adaptado de Trentin *et al.*, (2013)

Biofilmes podem ser formados por apenas um tipo de micro-organismo, ou monoespécie, sendo estes mais relacionados a tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, ou multiespécie, que são mais comuns na área de alimentos, onde se utilizam de outras superfícies (O'TOOLE *et al.*, 2000).

A adesão e a formação do biofilme são dependentes de características do microrganismo. A superfície aderente e outros fatores como temperatura, tempo de agitação, pH, dentre outros, também influenciam na formação destas estruturas (FLACH *et al.*, 2005; CAIXETA *et al.*, 2012).

Dentre os micro-organismos que podem participar de processos de adesão pode-se citar alguns *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (CAPELLETTI, 2006; LUCCHESI, 2006; CAIXETA *et al.*, 2012).

No entanto, nos casos em que as bactérias têm sucesso na formação de biofilme no hospedeiro, a infecção frequentemente torna-se crônica (BJARNSHOLT *et al.*, 2013).

2.2.1 Biofilmes e a indústria de alimentos

A formação de biofilmes em equipamentos pode ocasionar sérios problemas de higiene e perdas econômicas devido à contaminação e deterioração precoce dos alimentos e deficiência dos equipamentos (BREMER *et al.*, 2006; GRAM *et al.*, 2007).

Sua principal atribuição é ser uma barreira protetora capaz de prevenir o acesso físico de agentes antimicrobianos e agentes sanitizantes, restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes. São processos complexos que envolvem as características da bactéria (ELVERS; LAPPIN-SCOTT, 2000; GILBERT; DAS; FOLEY, 1997; TORTORA, 2000).

Sabe-se que os microrganismos aderidos são mais resistentes que as células de vida livre para sanitizantes, assim, se as células viáveis remanescentes são transferidas para um alimento, poderiam ter um impacto negativo na qualidade, armazenamento e segurança do mesmo. Infecções causadas por patógenos associados a alimentos capazes de formar biofilmes como *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. podem afetar seriamente a saúde pública em escala global, com grande impacto econômico (COUGHLAN et al., 2016).

No processo de formação de biofilme a fixação é o passo inicial para as bactérias colonizarem uma nova superfície através de mobilidade bacteriana (SERY et al., 2013).

Conhecer as condições que propiciam a formação de biofilme e as suas fragilidades é primordial para que estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, sejam dimensionadas para a eliminação de microrganismos na cadeia alimentar (HERRERA et al., 2007).

Diferentes cepas de *L. monocytogenes* têm se mostrado capaz de se ligar às superfícies abióticas com diferentes níveis de adesão, independentemente da superfície (vidro, plástico e aço inoxidável) ou temperatura (GAMBLE & MURIANA, 2007).

L. monocytogenes apresenta motilidade a partir de flagelos peritríquios em temperaturas até 30°C, com a transcrição do gene flagelar MogR, o que também pode ser relacionado à sua capacidade de adesão (HERALD e ZOTTOLA, 1988; VATANYOOPAISARN et al., 2000; LIU et al., 2002; FOLSOM et al., 2006).

Também é capaz de aderir e formar biofilmes em superfícies de contato como poliestireno (PS), vidro de politetrafluoroetileno (PTFE) e aço inoxidável (SS), persistindo por longos períodos (RENIER et al., 2011). Um dos maiores problemas dos biofilmes de *Listeria* na indústria de abate e processamento de carne é a persistência à dessecação, UV, e tratamentos com sanitizantes (GOMEZ et al., 2015).

Muitos agentes de desinfecção são eficazes contra *L. monocytogenes* em suspensão (AARNISALO et al., 2000). Porém, a natureza da estrutura do biofilme e os atributos fisiológicos dos organismos do biofilme conferem uma resistência natural aos agentes antimicrobianos (DONLAN & CONTERSTON, 2002).

A estratégia de inibir a formação de biofilmes objetiva intervir na adesão bacteriana primária a uma superfície biótica ou abiótica, sendo possível interferir nas interações bactéria-superfície ou nas interações bactéria-bactéria (MIQUEL et al., 2016).

2.3 Bactérias ácido lácticas (bals)

As bactérias ácido lácticas (BALs) compreendem um grupo de microrganismos com diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Podem apresentar forma de bacilos e cocos estar organizados em cadeia ou individualmente. São Gram positivas, catalase negativas, não esporuladas, anaeróbicas facultativas, capazes de realizar a fermentação tanto em anaerobiose como em aerobiose de uma forma mais lenta. Produtoras do ácido láctico como o principal produto final da fermentação dos açúcares, estão envolvidas na acidificação dos produtos alimentares destinados humanos e animais (BURGAIN et al., 2014; TAMANG et al., 2016).

Várias espécies e cepas de BAL produtoras de bacteriocinas já foram identificadas, pertencentes a diversos gêneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e *Enterococcus* (CHEN e HOOVER, 2003). Os *Lactobacillus spp.* são bactérias do ácido láctico Gram-positivas anaeróbicas aero tolerantes e homo fermentativas (VASIEE et al., 2015).

As BALs, quando usadas em alimentos, não tem potencial patogênico, além de serem excelentes produtoras de substâncias antimicrobianas, criando um microambiente desfavorável a diversos micro-organismos, inclusive aqueles com potencial patogênico, sendo esta característica a base de inúmeros métodos de conservação de alimentos por fermentação. (SETTACHAIMONGKON et al., 2016; PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017).

A atividade antimicrobiana das BALs tem sido relatada por diversos autores, por serem considerados micro-organismos seguros para o consumo (ANVISA, 2002), e por produzirem bacteriocinas, em quais possuem atividade antimicrobiana frente bactérias patogênicas (MADIGAN et al., 2004).

Pereira e Gomez (2007) demonstraram a atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus* frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, utilizando as metodologias de multicamadas e difusão em Ágar.

Entretanto, a atividade antibacteriana das BALs é mais associada as bactérias Gram positivas, como *Listeria monocytogenes* (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015; DIAS et al., 2015; SARAoui et al., 2016).

Dortu et al. (2008), estudaram o efeito individual e combinado das bacteriocinas *sakacina* e *sakacina* produzidas por *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus*, respectivamente, no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em carne bovina e carne de frango *in natura*. Os respectivos micro-organismos foram isolados dessas mesmas

matérias-primas, e foram aplicados nas superfícies das carnes previamente contaminadas. Ficou constatado o efeito sinérgico dessas duas bactérias na inibição de *L. monocytogenes*, principalmente na carne bovina, demonstrando o potencial de aplicação combinado das referidas BAL ou suas bacteriocinas na bioconservação de certos produtos cárneos.

Foi demonstrada a atividade do sobrenadante livre de células (CFS) contendo bacteriocinas sobre biofilmes de *L. monocytogenes*. Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação com diferentes meios de cultura e condições de incubação, mostrando que os CFS impediram a formação de biofilme, enquanto baixas concentrações de CFS, combinadas com EDTA, reduziram de forma significativa biofilmes já formados. (CAMARGO et al., 2016).

Rocha et al. (2019), mostraram a atividade inibitória de bacteriocinas produzidas por enterococos no desenvolvimento de biofilme e biofilme pré-formado de *Listeria*, concluindo que as bacteriocinas têm aplicações prospectivas na prevenção da formação de biofilme e / ou redução da viabilidade dos biofilmes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

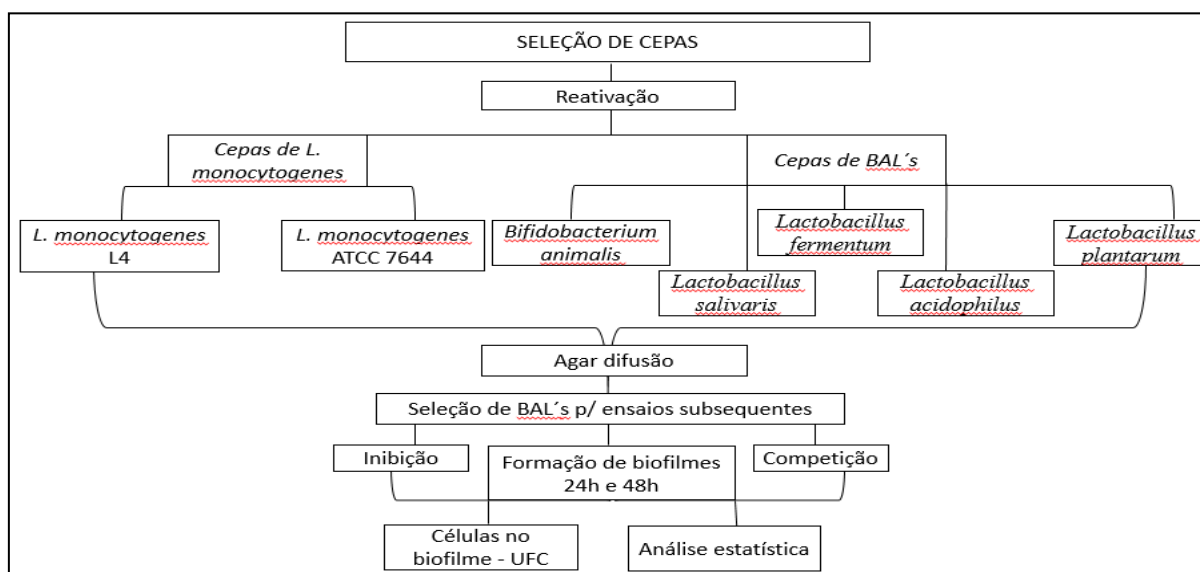
3.1 Cepas de bactérias ácido lácticas

As Bactérias Ácido Lácticas (BALs) utilizadas foram: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, e *Lactobacillus salivaris* (LEMMA) e *Lactobacillus acidophilus* (Pharmanostra), adquiridas de laboratórios especializados a partir de cepas comerciais liofilizadas, e a reativação das mesmas foram realizadas em caldo MRS a 30°C por 18 horas em trabalhos anteriores (MANTO, 2019).

Todos os isolados foram purificados por plaqueamento e identificados preliminarmente com base nas suas características morfológicas e de coloração (bacilos Gram positivos) e reação negativa à catalase (3% v/v H₂O₂). As BALs estavam armazenadas a -80°C em tubos de caldo MRS (Merck) suplementados com 20% (v/v) de glicerol estéril.

Na Figura 3 estão demonstradas as etapas do desenvolvimento deste projeto.

Figura 3 - Fluxograma das etapas de execução deste trabalho



Fonte: Autoria Própria, 2020.

3.2 Cepas de *L. Monocytogenes*

A cepa de *L. monocytogenes* utilizada foi isolada de esteiras de transporte de poliuretano em um abatedouro avícola (RODRIGUES et al., 2013), sendo denominada L4. Esta amostra foi submetida aos ensaios de capacidade de adesão em microplacas e resistência a sanitizantes (hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio) em trabalhos prévios, mostrando capacidade de adesão em todos os tempos (0, 4, 12 e 24 horas), temperaturas (42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C) e superfícies testadas (aço inoxidável, polietileno e poliuretano) (GEHLEN, 2016).

Como controle positivo foi utilizada uma cepa padrão *L. monocytogenes* ATCC 7644. Os isolados estavam congelados em caldo BHI com glicerol. A pureza das colônias foi verificada em meios de cultura seletivos e testes bioquímicos: Triplice Açúcar Ferro (TSI), LIA (*Lisina Iron Agar*), motilidade, indol, ureia, citrato, nitrato, vermelho de metila, ramanose e manitol.

3.3 Preparação do sobrenadante livre de células – bal's

Para preparar o sobrenadante das BALs (*Bifidobacterium animalis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivaris* e *L. acidophilus*) as culturas foram incubadas em caldo MRS (Merck) a 37° C por 24 h. O sobrenadante de cada cultura foi obtido por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min, neutralizado com NaOH 1 Molar (40g) para pH de 6,5 e filtrada em filtro de 0,22 µm.

As BALs foram parcialmente purificadas como descrito por Grosu-Tudor et al (2014), com modificações. Um volume de 30 mL do sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônia (saturação de 40%) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4 ° C.

3.4 Teste das bal's contra *L. monocytogenes* pelo método de ágar difusão

A atividade antimicrobiana das BALs foi avaliada por Ágar difusão conforme Balouiri et al. (2016), com modificações. Uma suspensão de *L. monocytogenes* padronizada em solução salina estéril (NaCl) ao equivalente a 0,5 da escala MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), 0,85%) foi semeada em Ágar BHI (Kavsi®) e, após 5 minutos, orifícios de 8 mm foram puncionados assepticamente com um perfurador estéril e um volume de 80 µL da suspensão das BALs (10^6 UFC/mL) foi inoculada nos poços.

As placas de ágar foram incubadas a 37°C por 24 horas. A inibição foi detectada pela presença de halos ao redor dos poços perfurados, onde não se verificava o crescimento dos microrganismos indicadores. As leituras dos halos de inibição foram mensuradas em milímetros, por meio de um paquímetro, tendo Tetraciclina (30µg – Laborclin®) como controle positivo, pois é um antibiótico natural usado no tratamento de um amplo espectro de bactérias gram-positiva. Este ensaio também foi realizado com suspensão de células das BALs previamente concentradas em centrifuga de tubos de ensaio a 2000rpm por 6 minutos, sendo removido o sobrenadante e as bactérias suspensas em caldo MRS. As BALs que apresentaram ação sobre *L. monocytogenes* foram selecionadas para os ensaios de inibição e/ou remoção de biofilmes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Ensaios de formação de biofilmes em placas de poliestireno

Os ensaios de capacidade de adesão em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (Kasvi®) foram conforme realizados conforme Stepanovic *et al.* (2004), Rodrigues *et al.* (2009) e Doijad *et al.* (2015).

Alíquotas de *Listeria* L4 e padrão ATTCC foram transferidas para caldo Listeria, sem glicose (Oxoid®), para incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas até atingir a escala 1 de MacFarland.

As culturas foram ajustada na escala de 0,5 McFarland e 200 μL transferidos para placas de poliestireno de 96 poços, sendo incubadas por 24 horas a 30°C e 37°C . Após, as suspensões bacterianas foram aspiradas de cada poço, lavadas 3 vezes com 250 μL NaCL a 0,85% estéril (Synth®), secando-se levemente a placa e as células bacterianas fixadas com 200 μL de metanol p.a. (Neon®) por 15 minutos. O metanol foi removido e as placas secas em temperatura ambiente. Em seguida, foram coradas com 200 μL de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec®) por cinco minutos, lavadas em água corrente, secas a temperatura ambiente e adicionados 250 μL ácido acético glacial 33%, sendo realizada a leitura em ELISA (Rosys Anthos® 2010) com absorvância a 550 nm e 595nm. O experimento foi realizado em triplicata.

O valor da densidade óptica de cada amostra (Doa) foi obtido pela média aritmética da absorvância dos três poços confrontada com a média da absorvância dos controles negativos (Docn), sendo classificadas como: não formadora de biofilme ($\text{Doa} \leq \text{Docn}$), fracamente formadora de biofilme ($\text{Docn} < \text{Doa} \leq 2.\text{Docn}$), moderadamente formadora de biofilme ($2.\text{Docn} < \text{Doa} \leq 4.\text{Docn}$) e fortemente formadora de biofilme ($4.\text{Docn} < \text{Doa}$) Stepanovic (2000).

3.5.1 Adesão bacteriana de bactérias ácido lácticas

Os ensaios foram realizados conforme item anterior com adaptações para as condições de crescimento das BALs (GOMEZ *et., al* 2016). Selecionou-se *Bifidobacterium animals* e *Lactobacillus plantarum* para os ensaios com biofilmes por terem apresentado halos de inibição frente as listerias avaliadas.

Foram adicionados 250 μL das suspensões das BALs (escala 1 de MacFarland, cerca de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL) em caldo MRS (18h) em placas de microtitulação de poliestireno com 96 cavidades (Kavi®), incubadas a 30°C e 37°C por 24h e 48h; e a leitura em ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 550 e 595 nm. Cada ensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle negativo caldo MRS não inoculado.

3.5.2 Inibição e competição da adesão de *L. monocytogenes* por bactérias ácido lácticas

Os ensaios de inibição e competição de adesão de *Listeria* em microplacas pelas BALs foram realizados conforme metodologia adaptada de Gong & Jiang (2017). As cepas de BALs foram cultivadas individualmente em caldo MRS por 18-24 h a $37\pm 1^\circ\text{C}$, em microaerofilia, e ajustadas na escala 1 de Mac Farland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Para avaliar a inibição da adesão de *Listeria* ATCC e L4 na superfície de poliestireno, inoculou-se 100 μL da suspensão das BALs individualmente, incubando-se a 30°C e 37°C por 48 horas. Após 24 horas foram adicionados 200 μL das BALs individualmente, e depois de 48 horas adicionados 100 μL das listerias, incubando-se por 24 horas a 30°C e 37°C totalizando 48 horas de incubação para o grupo controle com *Listeria* ATCC e L4 e 72 horas de crescimento das BALs.

Para avaliar a competição das BALs frente à adesão de listerias na superfície de poliestireno foram inoculados 200 μL da suspensão das bactérias em cada poço e 200 μL da suspensão de cada BAL, individualmente. Como controle positivo foram adicionados 200 μL da suspensão das BAL e como controle negativo 200 μL de MRS estéril. As microplacas foram incubadas a 30°C e 37°C por 48 h.

Após, os poços foram enxaguados com 200 μL solução de NaCl a 0,85% estéril (Synth®) por 3 vezes e seco a temperatura ambiente. Na sequência, as células bacterianas foram fixadas com 250 μL de metanol p.a. (Neon®) e removido após 15 minutos e as placas secas em temperatura ambiente. As placas foram coradas com 200 μL de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec®) por cinco minutos, lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente, sendo realizada a leitura, antes e após a adição de 250 μL ácido acético glacial 33%, da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 550 e 595nm.

Para avaliar o número viável de microrganismos aderentes, três poços para cada estirpe foram lavados três vezes e raspados. As suspensões obtidas foram transferidas para tubos estéreis e realizadas diluições em solução salina a 0,85% (p/v), plaqueadas em Agar Palcam para *L. monocytogenes*, pelo método *drop plate* (inoculação de cinco gotas de 10 μL de cada diluição). As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 h e realizadas as contagens bacterianas.

A porcentagem de inibição e competição de adesão de *Listeria* ATCC e L4 foi calculada conforme mostra a figura 4.

Figura 4 – Fórmula da porcentagem de inibição e competição de adesão de *Listeria* ATCC e L4

$$\% \text{ inibição ou competição} = \frac{\text{DO controle} - \text{DO Tratamento}}{\text{DO Controle}} * 100\%$$

Fonte: Gong & Jlang, 2017

3.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados expressos como média. Os desvios padrão foram determinados com o programa Excel e teste com intervalo de confiança de 95% com PASW Statistics-SPSS 17 (IBM Co.), para determinar a significância estatística dos dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ágar difusão

As BALs *Lactobacillus salivaris*, *L. acidophilus* e *L. fermentum* não apresentaram ação frente as amostras de *L. monocytogenes* avaliadas nos ensaios de Ágar difusão. A *Bifidobacterium animals* demonstrou os maiores halos de inibição variando de 22mm – 27mm enquanto a *Lactobacillus plantarum* demonstrou ação somente frente a *L. monocytogenes* ATCC com halos de 12mm – 13mm (tabela 1).

Tabela 1 – Média de halos de inibição (mm) das BALs frente a *L. monocytogenes* L4 e ATCC 7644

Halos de Inibição (mm)						
Tempo de incubação	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus salivares</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium animals</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
24h s/	LM ATCC	0	13	22 – 27	0	0
24 c/	LM ATCC	0	12 – 13	25 – 26	0	0
24/s	L4	0	0	23 – 24	0	0
24/c	L4	0	0	22 – 23	0	0

(*) As siglas *c/*, significam cultura e as *s/*, sobrenadante.

Fonte: Autoria Própria, 2020.

Lahtinem & Chioda (2007) relataram inibição de patógenos alimentares por cepas de *Bifidobacterium*. Todorov e colaboradores (2008), mostraram atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* de *L. plantarum*. Dasari *et al.* (2014), realizando estudo de atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp., no controle de bactérias patogênicas, encontrou resultados de inibição em Ágar difusão quando utilizado o sobrenadante de culturas de bactérias ácido lácticas.

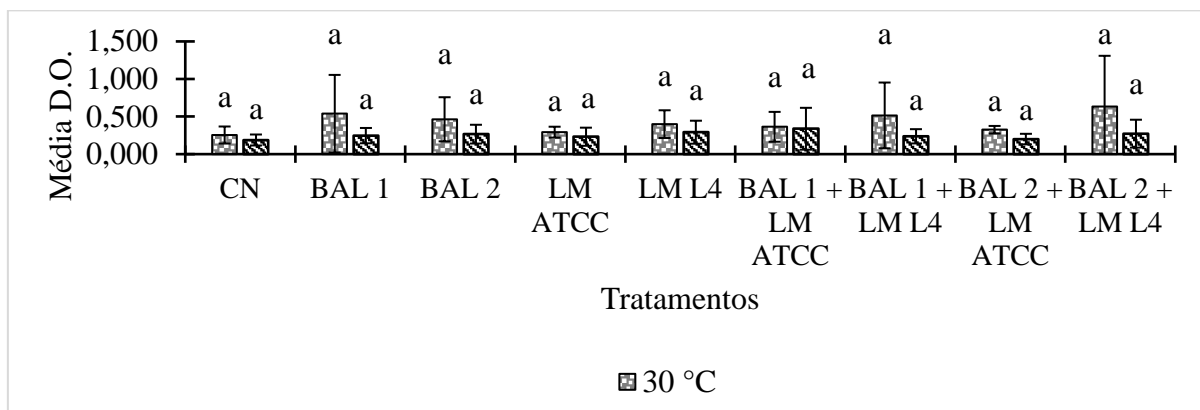
Com o interesse atual, pelos possíveis efeitos na saúde causados por microrganismos probióticos, a incorporação de BAL é uma excelente alternativa, pois além de garantir a segurança dos alimentos, também podem auxiliar no desenvolvimento de produtos cárneos funcionais com benefícios à saúde. São necessários dados precisos sobre as atividades promotoras da saúde de bactérias probióticas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além da comprovação da sua segurança para o consumo humano (SWETWIWATHANA; VISESSANGUAN, 2015).

Rosa (2001) analisou a atividade de uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake*, isolada de lingüça frescal, onde constatou o efeito bactericida contra *Listeria monocytogenes*.

4.2 Competição e inibição de adesão de listeria por bal's

A superfície de poliestireno utilizadas *in vitro* mimetizam alguns dos materiais plásticos utilizados em plantas de processamento de alimentos e apresenta uma boa repetibilidade para o objetivo proposto (PIRAS *et al.*, 2015). Os resultados dos ensaios de formação de biofilmes pelas BALs selecionadas, *Listeria* e as combinações estão apresentados na Figura 5.

Figura 5– Média da densidade optica da competição das Listerias e BAL's nos tratamentos de 30 °C e 37 °C



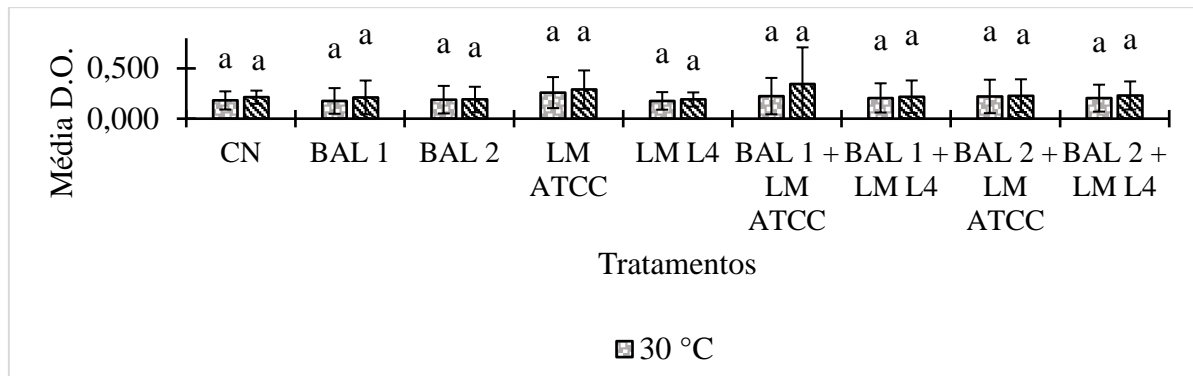
Legenda: Médias seguidas pelas letras minúsculas nas colunas, pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). BAL 1 (*Lactobacillus Plantarum*), BAL 2 (*Bifidobacterium animalis*).

Fonte: Autoria Própria, 2020.

L. monocytogenes e as BAL's foram capaz de formar biofilmes nas duas temperaturas testadas, mas com pouca aderência no pelo teste de competição. Porém, podemos observar que a BAL 1 (*Lactobacillus Plantarum*) apresentou melhor resultado de aderência em comparação a BAL 2 (*Bifidobacterium animalis*) nas duas temperaturas, assim no controle como no teste com *L. monocytogenes* ATCC e L4.

Na figura 6 podemos observar resultados na D.O pelo teste de inibição, podendo observar que não foi obtido diferença significativa.

Figura 6– Média da densidade óptica de inibição das *Listerias* e BAL's nos tratamentos de 30 °C e 37



Legenda: Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem, não obtendo diferença estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). BAL 1 (*Lactobacillus Plantarum*), BAL 2 (*Bifidobacterium animals*).

Fonte: Autoria Própria, 2020.

Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. A eficácia das BALs frente a diferentes *L. monocytogenes*, pode ser influenciada por diversos parâmetros tais com o pH, atividade em um substrato sólido ou pelo biofilme já formado, principalmente devido a densidade da matriz de substância polimérica (EPS), o que limita a difusão das BALs.

A extraordinária resistência de *L. monocytogenes* à ambientes ácidos, temperaturas variadas, umidade e concentração de sal, combinada com a sua capacidade para formar biofilmes e a sua resistência às práticas de limpeza e desinfecção de rotina, o torna um desafio significativo e contínuo para a indústria de alimentos (TODOROV, 2018).

As observações conflitantes sobre a formação dos biofilmes podem ser reflexo das diferentes superfícies e cepas analisadas, como também as condições experimentais aplicadas nos estudos. Isso também pode ser uma indicação da diversidade de respostas exibido por diferentes grupos bacterianos.

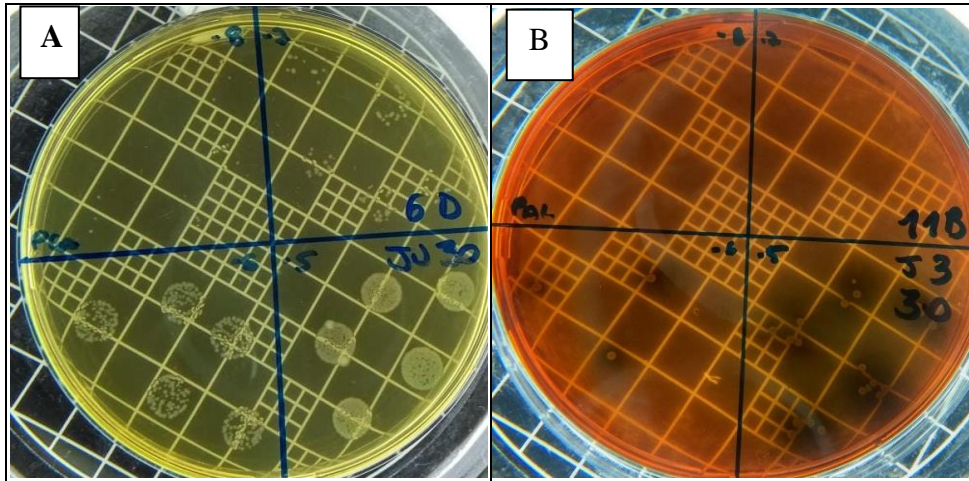
A capacidade de *L. monocytogenes* para formar um biofilme é dependente do sorotipo, temperatura, nível de nutrientes, exposição prévia a estressores ácido e da topografia e composição da superfície (BONSAGLIA et al., 2014; BARBOSA et al., 2013; MOSQUERA-FERNANDEZ et al., 2018).

4.3 Contagem de células

O plaqueamento foi feito pelo método de *drop plate* em triplicata em meios BHI e Palcam, incubados a 37 °C por 24 horas. A eficácia de cada BAL contra *L. monocytogenes* foi avaliada pela diferença entre o número de unidades formadoras de colônias de bactérias.

Na Figura 7 é possível observar a técnica de gotas para cada bactéria de estudo, onde foi possível a realização da contagem apenas na diluição 10^{-5} .

Figura 7- Procedimento de contagem pelo método de drop plate. (A) BAL, (B) L. monocytogenes

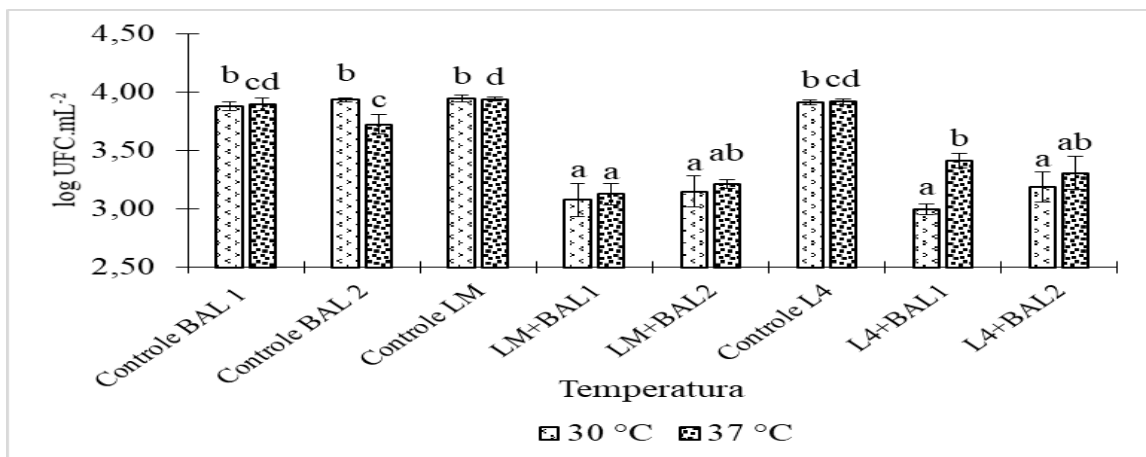


Fonte: Autoria Própria, 2020.

Assim, de acordo com a figura 8 é possível observar os diferentes valores de unidades formadoras de colônia para cada bactéria de estudo. Esses valores foram usados de forma a padronizar todos os inóculos utilizados durante os experimentos com as bactérias de estudo para formação de biofilmes.

A partir do crescimento nas placas, foi realizada a contagem das UFC e os resultados foram expressos em valores Log_{10} UFC/ml.

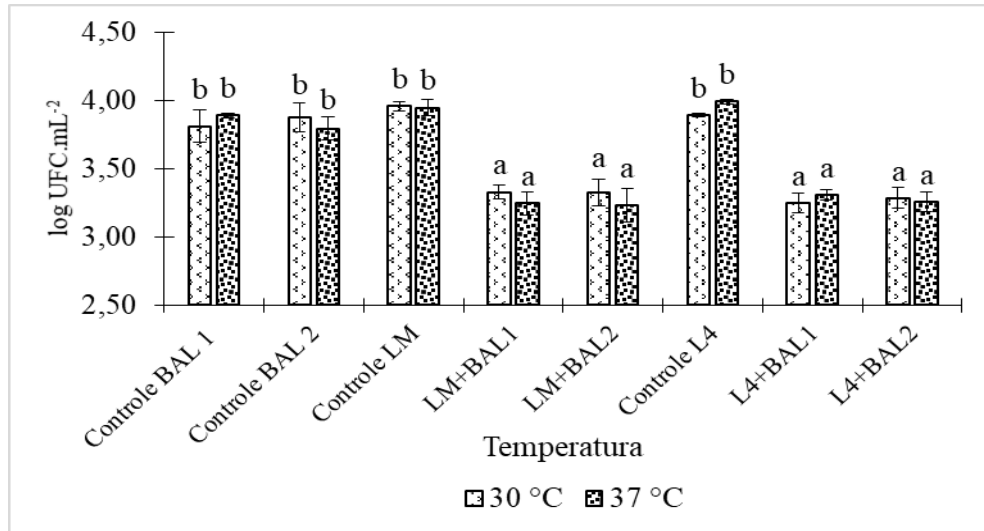
Figura 8– Quantificação em log_{10} UFC ml⁻² em diferentes temperaturas quanto a formação de biofilme em inibição



Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Autoria Pópria, 2020.
Fonte: Autoria Pópria, 2020.

Observou-se no resultado que a temperatura de 37°C apresentou um número maior no Log em comparação a 30 °C.

Figura 9– Quantificação em log₁₀ UFC ml⁻² em diferentes temperaturas quanto a formação de biofilme em competição



Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A letra (a) é referente ao teste das BAL's e Listerias e (b) aos controles. Fonte: Autoria Própria, 2020.

Observando os resultados de competições das BAL's com as Listerias, apresentaram resultados diferente ao teste de inibição, pois a temperatura de 30 °C apresentou maior Log, mas não obteve tanta diferença significativa.

As BALs testadas reduziram em relação a concentração inicial para as cepas de *L. monocytogenes*, porém não suficiente para reduzir uma grande camada de biofilme, não atingindo a redução de 5 Log. *L. monocytogenes* é considerada um dos patógenos de origem alimentar mais importante na atualidade, principalmente na indústria alimentícia, pela sua capacidade de contaminar ambientes, de processamento de alimentos, com grande possibilidades de formar biofilme em utensílios, equipamentos, pisos e drenos, atingindo produtos finais por contaminação cruzada (CAMARGO;WOODWARD; CALL; NERO, 2017).

Segundo Andrade e colaboradores, (2008) para ser considerado um biofilme, é necessário apresentar um número mínimo de 10^7 UFC/ cm². Este parâmetro é considerado extremamente importante pois o número inicial de microrganismos presente influencia a

formação de biofilme. Shinohara e colaboradores (2018) evidenciam a capacidade de adaptação dos microrganismos mesmo em condições ambientais desfavoráveis.

Sugere-se em trabalhos futuros o estudo da produção de biofilme por BAL's frente a *L. monocytogenes* em diferentes superfícies de contato, como metais e vidros, uma vez que são bastante utilizados na indústria alimentícia e nas residências dos consumidores, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

A *Bifidobacterium animalis* apresentou maior capacidade inibitória sobre *L. monocytogenes* em relação a *Lactobacillus plantarum*. Os ensaios não demonstraram diferença significativa na formação e remoção do biofilme pré-formado nos temperatura de 30 °C e 37 °C.

REFERÊNCIAS

- AARNISALO, K.; SALO, S.; MIETTINEN, H.; SUIHKO, M. L.; WIRTANEN, G.; AUTIO, T. **Bactericidal efficiencies of comercial disinfectants against *listeria monocytogenes* on surfaces**. Journal of Food Safety, V.20, p.237–250, 2000.
- ALONSO, B; CRUCES, R; PERÉZ, A; SÁNCHEZ-CARRILO, C; GUEMBE, M. **Comparison of the XTT and resazurin assay for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* bioflm**. J Microbiol Methods 139:135–137, 2017.
- ANDRADE, J. M. **Listeria monocytogenes formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua sensibilidade aos sanitizantes**. 43f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. **Controle da higienização na indústria de alimentos**. In: ANDRADE, N. J. (Ed.) Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela; 2008. p.181- 226.
- BALOUIRI M., SADIKI M, KOTAICHIIBNSOUDA S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Jour of Phar Anal**, v. 6, p. 71–79, 2016.
- BOLOCAN, A.S; PENNONE, V; O'CONNOR, P.M; COFFEY, A; NICOLAU, A.I; MCAULIFFE, O; JORDAN K. Inhibition of listeria of monocytogenes biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. **J. APPL Microbiol**. 279-293; Jan, 2017.
- BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory Scale Clean-In Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.254-262, 2006.
- BRUNO, L. M. **Manual de curadores de germoplasma – Microrganismos: bactérias ácido lácticas**. Brasília/DF: Embrapa Recursros Genéticos e Biotecnologia. 2011.
- CAMARGO, A.C; DE PAULA, O.A; TODOROV, S.D; NERO, L.A. In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Appl Biochem Biotechnol**, 2016.
- CARRASCOSA, C., MILLÁN, R., SAAVEDRA, JABER, J. R., RAPOSO, A., SANJUÁN, E. Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. **J. Dairy Sci**. v. 99, p. 1–11, 2016.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Listeria (*Listeriosis*)**, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>. Acesso em: 20 maio 2020.
- CEZAR, Vanessa Danesi dos Santos et al. Susceptibilidade de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em produtos lácteos no Rio Grande do Sul frente a diferentes desinfetantes. **Revista Fases Ciências**, v.3, p. 100-111, Jan. /Jun. de 2013.

CHEN, H; HOWER, D.G. Bacteriocins e suas aplicações alimentares. **Food Sci Food Saf**, v. 2, p. 82-100, 2033.

CHIODA, T.P; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P; GARCIA, G.R; PIGATTO, C.P; RIBEIRO, C.A.M; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Universidade Federal de Santa Maria. mar-abr, 2007.

COSTERTON, B.; DIRCKX, P. **Quorum sensing**. Center for Biofilm Engineering. Acesso em: 2019.

COSTERTON, J. W. **Introduction to biofilm**. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, p. 217–221, 1999.

DAL BELLO B, COCOLIN L., ZEPPA G, CAMPO D, COTTER PD, HILL C. Cha Tecnológico caracterização da produção de bacteriocinas *Lactococcus lactis* cepas empregadas para controlar *Listeria monocytogenes* em queijo cottage. **Int. J. Food Microbiol.** 153: 58-65, 2012.

DASARI, S.; SHOURI, R. N. D.; WUDAYAGIRI, R.; VALLURU, L. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* against microbial flora of cervicovaginal infections. **Asian Pac Jour Trop Dis.** 2014.

DIAS, D. A. M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2008. 84 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DOIJAD, S.P; BARBUDDHE, S.B; GARG, S; POHARKAR, K.V; KALOVERY, D.R; KURKURE, N.V. Habilidades de formação de biofilme de sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados de diferentes fontes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>

DONLAN, M. R.; COSTERTON, J. W. **Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms**. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p. 167–193, 2002.

DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, p. 183-194, 2001.

FARBER, M; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p. 476-511, 1991.

FERNANDES, R. P. P.; FREIRE, M, T, A; PAULA, E. S. M.; KANASHIRO, A. L. S.; CATUNDA, F. A. P; ROSA, A.F; BALIEIRO, J. C. C; TRINDADE, M. A. Stability of lamb loin stored under 145 refrigeration and packed in different modified atmosphere packaging systems. **Meat Science**, v. 96, p. 554–561, 2014.

FERREIRA, V; WIEDMANN, M; TEIXEIRA, P; STASIEWICZ, M.J. *Listeria monocytogenes* persistência em ambientes associados a alimentos: epidemiologia,

características de estirpes e implicações para a saúde pública. **J Food Prot**, v. 77, p. 150 – 170, 2014.

FLEMMING, *et al.* **Biofilms**: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol.** v.14, p.563-575, 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GAMBLE, R.; MURIANA, P. M. A microplate fluorescence assay for the measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat processing plants to adhere to abiotic surfaces. **Applied Environment Microbiology**, v.73, p.5235–5244, 2007.

GARCIA, K.C.O.D; CORREIA, I.M.O; PEREIRA, L.Q; SILVA, T.M, et. al. Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. **Poultry Science**, v.96, n. 9, p. 3393-3398, 2017.

GEHLEN, S.S. **Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies por *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização**. Dissertação: em Ciências Veterinárias na Área de Sanidade Avícola. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2016.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Listeria* spp.** 2015. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero%20Listeria%204-2015.pdf> . Acesso em: 15 maio 2020.

GÓMEZ, N. C *et al.* A. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 30, p. 51–58, 2012.

GÓMEZ, N.C *et al.* Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Front in Microb**, 2016.

GONG, C; JIANG, X. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. **Poultry Sci**, v. 0, p. 1-11, 2017.

GRAM, L; BAGGE-RAVN, D. et al. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.1165–1171, 2007.

HARTMANN, W. Qualidade microbiológica do leite cru produzido na Região Oeste do Paraná e ocorrência de *Listeria monocytogenes*. **Ars Veterinaria**, v.25, n.2, p.072-078, 2009.

HAYES, P. R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, p.187- 196, 1993.

HOLAH, J.T; TAYLOR, J.H; DAWSON, D.J; HALL, K.E. Uso de biocidas na indústria alimentícia e resistência a desinfetantes de cepas persistentes de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* . **J. Appl. Microbiol.** 92: 111S-120S, 2002.

HUANG, Y. T.; LIAO, C. H.; YANG, C. J.; TENG, L. J.; WANG, J. T.; HSUEH, A. P. Listeriosis, Taiwan, 1996–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1731- 1733, 2011.

JAY, J. M. **Listerioses de origem animal**. In: JAY, J. M. (Eds.). *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

LAHTINEN, S.J; JALONEN, L; OUWEHAND, A.C; SALMINEN, S.J. Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. **Inter Jour of Food Microbiol.** 2007.

LIU, D. **Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen**. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, p. 645–659, 2006.

LOGUERCIO, A. P. SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, 2001.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Evolução e sistemática microbianas**. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, p. 302-330, 2004.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**, v.53, p.742–746, 1990.

MANTO, L. **Ação in vitro de bactérias ácido lácticas frente a *Salmonella Heidelberg* multipresente e formadora de biofilmes**. Universidade de Passo Fundo, 2019.

MATOS, Eduardo. **Polícia Civil vai investigar contaminação em fatiados da rede Zaffari**. Gaúcha ZH. 2017. Disponível em: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/portoalegre/noticia/2017/09/policia-civil-vai-investigar-contaminacao-em-fatiados-da-rede-zaffari9885928.html>. Acesso em: 29 jun. 2019.

PAPADIMITRIOU, K; ZOUMPOPOULOU, G; FOLIGNÉ, B; ALEXANDRAKI, V; KAZOU, M; POT, B; TSAKALIDOU, E. Descoberta de microrganismos probióticos: abordagens *in vitro*, *in vivo*, genéticas e ômicas. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 58, p. 1-4, 2015.

PAPAVASILEIOU, K; PAPAVASILEIUO, E; TSELENI-KOTSOVILI, A; BERSIMIS, S. et al. Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella enterica* strains isolated from children with gastroenteritis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 2010.

PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGÉ, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 55, p. 121-126, 2000.

POSFAY-BARBE, K. M.; WALD, E. R. Listeriosis. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 14, n. 4, p.228-33, 2009.

RISTORI, C. A., ROWLANDS, R. E., MARTINS, C. G., BARBOSA, M. L., YOSHIDA, J. T., FRANCO, B. D. Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathog Dis**, v. 11, n. 12, p.969- 73, 2014.

ROCHA, K. T; PERINI, H. F; SOUZA, C. M; SCHUELER, J; TOSONI, N. F; FURLANETO, M.C; MAIA, L. F. **Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria innocua***. World Journal of Microbiology and Biotechnology
ROCOURT, J. **The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification**. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. *Listeria*, listeriosis, and food safety. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.1-20.

ROCOURT, J.; COSSART, P. ***Listeria monocytogenes***. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds.). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM, 1997. p. 337-352.

RODRIGUES, L.B. **Avaliação da formação de biofilmes e das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de cortes de matadouro de aves**. [Tese] Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

RODRÍGUEZ, A; MEDINA, Á; CÓRDOBA, J.J; MAGAN, N. The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. **International Journal of Food Microbiology**, 178, 113-119, 2014.

SASAHARA, K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilize a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of Food Protection**, v.56, p.1022–1028, 1993.

SHINOHARA, N. K. S.; FREITAS, F.; PIRES, E. F.; ANDRADE, S. A. C.; FILHO, J.L.L.; SOUSA, P. H. M. Statistical evaluation of mathematical models for *Salmonella typhimurium* growth and listeria. **Revista Geama**, v. 4, p. 33-38, 2018.

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, R. P.; DUVALL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Br. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, 2004.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Jour Microb Meth**, v. 40, p.175-179, 2000.

STEPANOVIC, S; IRKOVIC, I.C; RANIN, L; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett in App Microb**, v. 38, p. 428–432, 2004.

SWETWIWATHANA, A.; VISESSANGUAN, W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. **Meat Science**, v. 109, p. 101-105, 2015.

TODOROV, D. S; OTÁVIO, A.L. et al. Efecto combinado de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* ST8SH y la vancomicina, el própolis o el EDTA para controlar o

desenvolvimento do biofilme produzido por *Listeria monocytogenes*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, p. 48-55, 2018.

VASIEE, A; YAZDI, F; MORTAZAVI, A; EDALATIAN, M. Isolamento, identificação e caracterização de *Lactobacilli spp.* de Tarkhineh. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 6, p. 2487-2490, 2014.

APÊNDICE – ARTIGO PARA SUBMISSÃO

AÇÃO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS FRENTE A *Listeria monocytogenes* FORMADORA DE BIOFILMES

Juliana Sousa Bogéa, Luciana Ruschel dos Santos

Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Estado Rio Grande do Sul, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Rio Grande do Sul/ Brasil

RESUMO

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica causadora de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA), amplamente distribuída no ambiente e que pode sobreviver em instalações de processamento de alimentos por meses ou anos. Ela é uma bactéria Gram-positiva com grande preocupação para os operadores de empresas do setor alimentício devido à sua patogenicidade e capacidade de formar biofilmes em ambientes de produção de alimentos. Acredita-se que a *L. monocytogenes* possa ser mantida nos alimentos prontos para consumo, que não serão expostos à processamento térmico posterior, o que poderia levar as DVAs. Os tratamentos para remoção e controle de biofilmes são um desafio, já que podem resistir nas superfícies inertes da indústria e ser resistentes aos sanitizantes usualmente utilizados. As bactérias ácido lácticas (BALs) são as principais representantes dos probióticos em alimentos, proporcionando efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. A aplicação de BAL's em alimentos com capacidade de inibir a multiplicação de micro-organismos indesejáveis (deteriorantes e/ou patogênicos) é uma estratégia utilizada na bioconservação de alimentos e que poderia ser aplicada como controle de biofilmes nas superfícies de contato. Neste estudo avaliamos a ação das bactérias ácido lácticas para a inibição e/ou remoção biofilme de *L.monocytogenes* por *Lactobacillus Plantarum* e *Bifidobacterium animalis* em temperaturas de 30 °C e 37 °C. Os resultados mostram atividade em células de *Lactobacillus Plantarum* e *Bifidobacterium animalis* em comparação com a própria *L.monocytogenes* ATCC e L4. E também inibiu a formação dos biofilmes em desenvolvimento por *Lactobacillus plantarum* e *bifidobacterium animalis* contra *L. monocytogenes*. Estes resultados mostram o potencial do uso de BAL's contra patógenos no ambiente de produção de alimentos.

Palavras-Chaves: bactérias ácido lácticas, biofilme, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogenic bacterium that causes Foodborne Diseases (DVA), widely distributed in the environment and that can survive in food processing facilities for months or years. Even after cleaning and sanitizing procedures, the bacteria can remain in food processing environments both in sessile form and in biofilms, contaminated food and surfaces. The control and removal of biofilms are hampered by adhesion to surfaces as well as their increasing resistance to the commonly used sanitizers in the industry. Lactic acid bacteria (BALs) can inhibit or delay the multiplication of microorganisms in food and would be an alternative to control biofilms on contact surfaces. Thus, this work evaluated the action of five BALs in inhibiting and / or removing biofilms from *L. monocytogenes* previously identified as strongly adherent. The bacteria used were *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivaris* and *L. acidophilus*, tested in the Agar Diffusion tests. From these preliminary tests it was identified that *B. animalis* and *L. plantarum* showed action on *L.*

monocytogenes, being then selected for the biofilm formation tests in microplates at temperatures of 30 ° C and 37 ° C. The BAL's and Listerias were effective in forming the biofilm individually, however they did not show statistically significant difference in the temperatures of 30 ° C and 37 ° C. The reduction of biofilm biomass in development of the production of *L. Plantarum* and *B. Animalis* against *L. monocytogenes* ATCC and L4 when evaluated by cell count using the UFC drop plate method, it was observed that it was not fully efficient to reduce a large *Listeria* biofilm layer, not reaching the 5 Log reduction. In general, BALs can offer significant improvements in food safety, but require other alternative strategies adopted for the formation and inhibition of biofilms against *L. monocytogenes*.

Keywords: *L. monocytogenes*; lactic acid bacteria; biofilms.

INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é reconhecida como um microrganismo de importância tanto para saúde pública quanto para a indústria de alimentos, devido sua patogenicidade e capacidade de sobrevivência em diversas condições ambientais e alimentos prontos para consumo (RODRÍGUEZ, 2017). A *L. monocytogenes* é um dos principais micro-organismos patogênicos que oferecem risco a saúde do consumidor ao provocar Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) (Costa, 2008).

A persistência de *L. monocytogenes* nas superfícies pode ser influenciada por propriedades específicas de cada cepa, como na capacidade de aderência ao aço inoxidável e susceptibilidade aos desinfetantes, que influenciam diretamente na formação de biofilmes (CEZAR et al., 2013; DIAS, 2008).

Na forma de biofilmes os microrganismos apresentam maior resistência aos agentes de limpeza e sanitização, o que dificulta ou inviabiliza os processos de sanitização, uma vez que quando aderidos às superfícies de contato com alimento podem não ser completamente removidos e se desprender destas superfícies, contaminando os alimentos e mantendo a contaminação ambiental (OLIVEIRA et al., 2010 Ferreira et al.2014; Buchanan et al. 2017; Camargo et al. 2018).). Esta resistência das bactérias quando na forma de biofilmes representa um desafio para o controle de *L. monocytogenes* nas indústrias, o que tem levado a pesquisas com métodos alternativos de diminuição ou eliminação do microrganismo.

As bactérias ácido lácticas (BALs) tem alta ocorrência na natureza e não apresentariam riscos à saúde pública, situam-se dentre as alternativas consideradas promissoras para prevenção da resistência a antimicrobianos com. As BALs já vem sendo aplicadas em alimentos como uma das formas de controle de DVAs (Anderson et al., 2018) e poderiam também ser usadas como biocontrole em superfícies de contato com alimentos.

Assim, considerando a necessidade de redução de antimicrobianos e substâncias químicas no processamento de alimentos, neste estudo avaliou-se a capacidade das BALs na inibição ou competição da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em microplacas de polietileno.

MATERIAIS E MÉTODOS

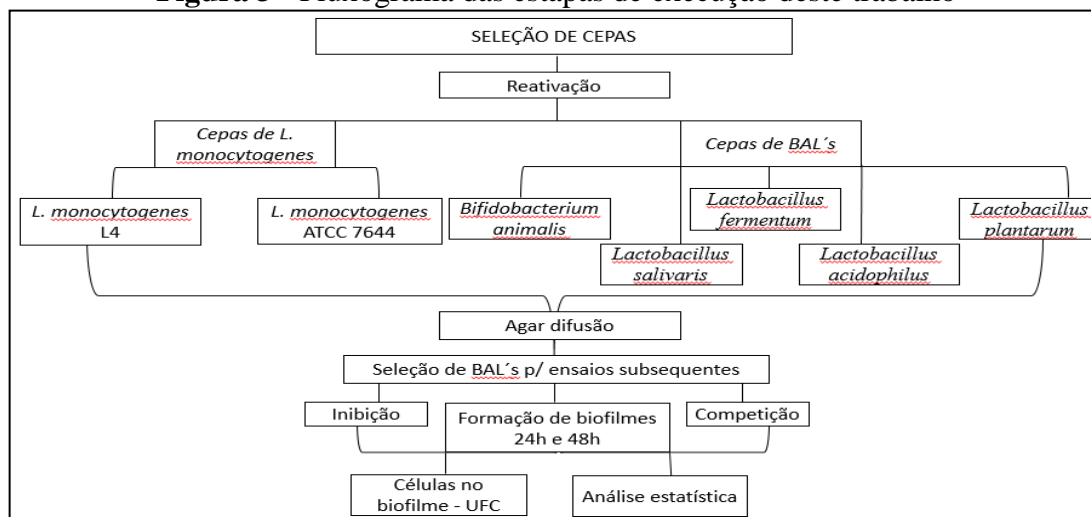
Cepas de bactérias ácidos lácticas

As Bactérias Ácido Lácticas (BALs) utilizadas foram: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, e *Lactobacillus salivaris* (LEMMA) e *Lactobacillus acidophilus* (Pharmanostra), adquiridas de laboratórios especializados a partir de cepas comerciais liofilizadas, e a reativação das mesmas foram realizadas em caldo MRS a 30°C por 18 horas em trabalhos anteriores (MANTO, 2019).

Todos os isolados foram purificados por plaqueamento e identificados preliminarmente com base nas suas características morfológicas e de coloração (bacilos Gram positivos) e reação negativa à catalase (3% v/v H₂O₂). As BALs estavam armazenadas a -80°C em tubos de caldo MRS (Merck) suplementados com 20% (v/v) de glicerol estéril.

Na Figura 3 estão demonstradas as etapas do desenvolvimento deste projeto.

Figura 3 - Fluxograma das etapas de execução deste trabalho



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Cepas de *L. monocytogenes*

A cepa de *L. monocytogenes* utilizada foi isolada de esteiras de transporte de poliuretano em um abatedouro avícola (RODRIGUES et al., 2013), sendo denominada L4. Esta amostra foi submetida aos ensaios de capacidade de adesão em microplacas e resistência a sanitizantes (hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio) em trabalhos prévios, mostrando capacidade de

adesão em todos os tempos (0, 4, 12 e 24 horas), temperaturas ($42\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) e superfícies testadas (aço inoxidável, polietileno e poliuretano) (GEHLEN, 2016).

Como controle positivo foi utilizada uma cepa padrão *L. monocytogenes* ATCC 7644. Os isolados estavam congelados em caldo BHI com glicerol. A pureza das colônias foi verificada em meios de cultura seletivos e testes bioquímicos: Triplice Açúcar Ferro (TSI), LIA (*Lisina Iron Agar*), motilidade, indol, ureia, citrato, nitrato, vermelho de metila, ramanose e manitol.

Preparação do sobrenadante livre de células – Bal's

Para preparar o sobrenadante das BALs (*Bifidobacterium animalis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivaris* e *L. acidophilus*) as culturas foram incubadas em caldo MRS (Merck) a 37°C por 24 h. O sobrenadante de cada cultura foi obtido por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min, neutralizado com NaOH 1 Molar (40g) para pH de 6,5 e filtrada em filtro de $0,22\ \mu\text{m}$.

As BALs foram parcialmente purificadas como descrito por Grosu-Tudor et al (2014), com modificações. Um volume de 30 mL do sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônia (saturação de 40%) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4°C .

Teste das Bal's contra *L.monocytogenes* pelo método de ágar difusão

A atividade antimicrobiana das BALs foi avaliada por Ágar difusão conforme Balouiri et al. (2016), com modificações. Uma suspensão de *L. monocytogenes* padronizada em solução salina estéril (NaCl) ao equivalente a 0,5 da escala MacFarland ($1,5\times 10^8$ UFC/mL), 0,85%) foi semeada em Ágar BHI (Kavsi®) e, após 5 minutos, orifícios de 8 mm foram puncionados assepticamente com um perfurador estéril e um volume de 80 μL da suspensão das BALs (10^6 UFC/mL) foi inoculada nos poços.

As placas de ágar foram incubadas a 37°C por 24 horas. A inibição foi detectada pela presença de halos ao redor dos poços perfurados, onde não se verificava o crescimento dos microrganismos indicadores. As leituras dos halos de inibição foram mensuradas em milímetros, por meio de um paquímetro, tendo Tetraciclina (30 μg – Laborclin®) como controle positivo, pois é um antibiótico natural usado no tratamento de um amplo espectro de bactérias gram-positiva. Este ensaio também foi realizado com suspensão de células das BALs previamente concentradas em centrifuga de tubos de ensaio a 2000rpm por 6 minutos, sendo removido o sobrenadante e as bactérias suspensas em caldo MRS. As BALs que apresentaram ação sobre *L. monocytogenes* foram selecionadas para os ensaios de inibição e/ou remoção de biofilmes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Ensaio de formação de biofilmes em placas de poliestireno

Os ensaios de capacidade de adesão em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (Kasvi®) foram conforme realizados conforme Stepanovic *et al.* (2004), Rodrigues *et al.* (2009) e Doijad *et al.* (2015).

Alíquotas de *Listeria* L4 e padrão ATTCC foram transferidas para caldo Listeria, sem glicose (Oxoid®), para incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas até atingir a escala 1 de MacFarland.

As culturas foram ajustada na escala de 0,5 McFarland e 200 μL transferidos para placas de poliestireno de 96 poços, sendo incubadas por 24 horas a 30°C e 37°C . Após, as suspensões bacterianas foram aspiradas de cada poço, lavadas 3 vezes com 250 μL NaCl a 0,85% estéril (Synth®), secando-se levemente a placa e as células bacterianas fixadas com 200 μL de metanol p.a. (Neon®) por 15 minutos. O metanol foi removido e as placas secas em temperatura ambiente. Em seguida, foram coradas com 200 μL de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec®) por cinco minutos, lavadas em água corrente, secas a temperatura ambiente e adicionados 250 μL ácido acético glacial 33%, sendo realizada a leitura em ELISA (Rosys Anthos® 2010) com absorvância a 550 nm e 595nm. O experimento foi realizado em triplicata.

O valor da densidade óptica de cada amostra (Doa) foi obtido pela média aritmética da absorvância dos três poços confrontada com a média da absorvância dos controles negativos (Docn), sendo classificadas como: não formadora de biofilme ($\text{Doa} \leq \text{Docn}$), fracamente formadora de biofilme ($2 \cdot \text{Docn} < \text{Doa} \leq 4 \cdot \text{Docn}$), moderadamente formadora de biofilme ($4 \cdot \text{Docn} < \text{Doa} \leq 8 \cdot \text{Docn}$) e fortemente formadora de biofilme ($\text{Doa} > 8 \cdot \text{Docn}$) Stepanovic (2000).

Adesão bacteriana de bactérias ácido lácticas

Os ensaios foram realizados conforme item anterior com adaptações para as condições de crescimento das BALs (GOMEZ *et. al* 2016). Selecionou-se *Bifidobacterium animals* e *Lactobacillus plantarum* para os ensaios com biofilmes por terem apresentado halos de inibição frente as listerias avaliadas.

Foram adicionados 250 μL das suspensões das BALs (escala 1 de MacFarland, cerca de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL) em caldo MRS (18h) em placas de microtitulação de poliestireno com 96 cavidades (Kavi®), incubadas a 30°C e 37°C por 24h e 48h; e a leitura em ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 550 e 595 nm. Cada ensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle negativo caldo MRS não inoculado.

Inibição e competição da adesão de *L. monocytogenes* por bactérias ácido láctica

Os ensaios de inibição e competição de adesão de *Listeria* em microplacas pelas BALs foram realizados conforme metodologia adaptada de Gong & Jiang (2017). As cepas de BALs foram cultivadas individualmente em caldo MRS por 18-24 h a $37\pm 1^\circ\text{C}$, em microaerofilia, e ajustadas na escala 1 de Mac Farland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Para avaliar a inibição da adesão de *Listeria* ATCC e L4 na superfície de poliestireno, inoculou-se 100µL da suspensão das BALs individualmente, incubando-se a 30°C e 37°C por 48 horas. Após 24 horas foram adicionados 200µL das BALs individualmente, e depois de 48 horas adicionados 100µL das listerias, incubando-se por 24 horas a 30°C e 37°C totalizando 48 horas de incubação para o grupo controle com *Listeria* ATCC e L4 e 72 horas de crescimento das BALs.

Para avaliar a competição das BALs frente à adesão de listerias na superfície de poliestireno foram inoculados 200µL da suspensão das bactérias em cada poço e 200µL da suspensão de cada BAL, individualmente. Como controle positivo foram adicionados 200µL da suspensão das BAL e como controle negativo 200 µL de MRS estéril. As microplacas foram incubadas a 30°C e 37°C por 48 h.

Após, os poços foram enxaguados com 200µL solução de NaCl a 0,85% estéril (Synth®) por 3 vezes e seco a temperatura ambiente. Na sequência, as células bacterianas foram fixadas com 250 µL de metanol p.a. (Neon®) e removido após 15 minutos e as placas secas em temperatura ambiente. As placas foram coradas com 200 µL de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec®) por cinco minutos, lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente, sendo realizada a leitura, antes e após a adição de 250µL ácido acético glacial 33%, da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 550 e 595nm.

Para avaliar o número viável de microrganismos aderentes, três poços para cada estirpe foram lavados três vezes e raspados. As suspensões obtidas foram transferidas para tubos estéreis e realizadas diluições em solução salina a 0,85% (p/v), plaqueadas em Agar Palcam para *L. monocytogenes*, pelo método *drop plate* (inoculação de cinco gotas de 10µL de cada diluição). As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 h e realizadas as contagens bacterianas.

A porcentagem de inibição e competição de adesão de *Listeria* ATCC e L4 foi calculada conforme mostra a figura 4.

Figura 4 – Fórmula da porcentagem de inibição e competição de adesão de *Listeria* ATCC e L4

$$\% \text{ inibição ou competição} = \frac{\text{DO controle} - \text{DO Tratamento}}{\text{DO Controle}} * 100\%$$

Fonte: Gong & Jlang, 2017.

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados expressos como média. Os desvios padrão foram determinados com o programa Excel e teste com intervalo de confiança de 95% com PASW Statistics-SPSS 17 (IBM Co.), para determinar a significância estatística dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ágar Difusão

As BALs *Lactobacillus salivaris*, *L. acidophilus* e *L. fermentum* não apresentaram ação frente as amostras de *L. monocytogenes* avaliadas nos ensaios de Agar difusão. A *Bifidobacterium animalis* demonstrou os maiores halos de inibição variando de 22mm – 27mm enquanto a *Lactobacillus plantarum* demonstrou ação somente frente a *L. monocytogenes* ATCC com halos de 12mm – 13mm (tabela 1).

Tabela 1 – Média de halos de inibição (mm) das BALs frente a *L. monocytogenes* L4 e ATCC 7644.

Halos de Inibição (mm)						
Tempo de incubação	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus salivares</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
24h s/	LM ATCC	0	13	22 – 27	0	0
24 c/	LM ATCC	0	12 – 13	25 – 26	0	0
24/s	L4	0	0	23 – 24	0	0
24/c	L4	0	0	22 – 23	0	0

(*) As siglas c/, significam cultura e as s/, sobrenadante

Fonte: Autoria Própria, 2020.

Lahtinem & Chioda (2007) relataram inibição de patógenos alimentares por cepas de *Bifidobacterium*. Todorov e colaboradores (2008), mostraram atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* de *L. plantarum*. Dasari *et al.* (2014), realizando estudo de atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp., no controle de bactérias patogênicas, encontrou

resultados de inibição em Ágar difusão quando utilizado o sobrenadante de culturas de bactérias ácido lácticas.

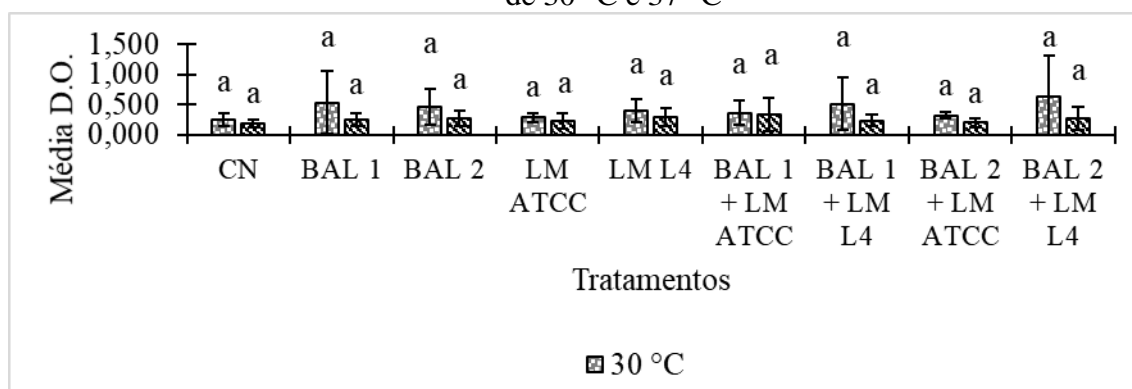
Com o interesse atual, pelos possíveis efeitos na saúde causados por microrganismos probióticos, a incorporação de BAL é uma excelente alternativa, pois além de garantir a segurança dos alimentos, também podem auxiliar no desenvolvimento de produtos cárneos funcionais com benefícios à saúde. São necessários dados precisos sobre as atividades promotoras da saúde de bactérias probióticas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além da comprovação da sua segurança para o consumo humano (SWETWIWATHANA e VISESSANGUAN, 2015).

Rosa (2001) analisou a atividade de uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake*, isolada de linguiça frescal, onde constatou o efeito bactericida contra *Listeria monocytogenes*.

Competição e inibição de adesão de listeria por Bal's

A superfície de poliestireno utilizadas *in vitro* mimetizam alguns dos materiais plásticos utilizados em plantas de processamento de alimentos e apresenta uma boa repetibilidade para o objetivo proposto (PIRAS *et al.*, 2015). Os resultados dos ensaios de formação de biofilmes pelas BALs selecionadas, *Listeria* e as combinações estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Média da densidade optica da competição das Listerias e BAL's nos tratamentos de 30 °C e 37 °C



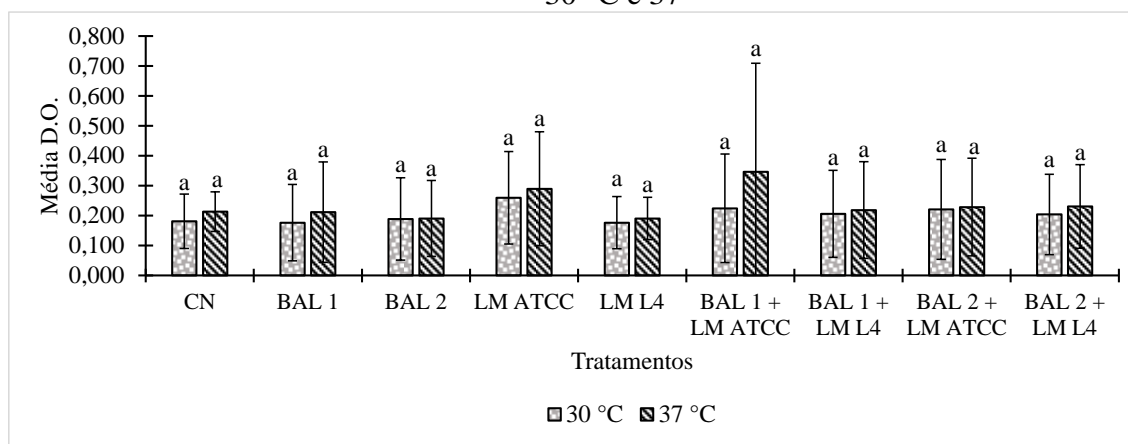
Legenda: Médias seguidas pelas letras minúsculas nas colunas, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). BAL 1 (*Lactobacillus Plantarum*), BAL 2 (*Bifidobacterium animalis*).

Fonte: Autoria Própria, 2020.

L. monocytogenes e as BAL's foram capaz de formar biofilmes nas duas temperaturas testadas, mas com pouca aderência no pelo teste de competição. Porém, podemos observar que a BAL 1 (*Lactobacillus Plantarum*) apresentou melhor resultado de aderência em comparação a BAL 2 (*Bifidobacterium animalis*) nas duas temperaturas, assim no controle como no teste com *L. monocytogenes* ATCC e L4.

Na figura 6 podemos observar resultados na D.O pelo teste de inibição, podendo observar que não foi obtido diferença significativa.

Figura 6 – Média da densidade optica de inibição das Listerias e BAL's nos tratamentos de 30 °C e 37



Legenda: Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem, não obtendo diferença estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). BAL 1 (*Lactobacillus Plantarum*), BAL 2 (*Bifidobacterium animals*).

Fonte: Autoria Própria, 2020.

Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. A eficácia das BALs frente a diferentes *L. monocytogenes*, pode ser influenciada por diversos parâmetros tais com o pH, atividade em um substrato sólido ou pelo biofilme já formado, principalmente devido a densidade da matriz de substância polimérica (EPS), o que limita a difusão das BALs.

A extraordinária resistência de *L. monocytogenes* à ambientes ácidos, temperaturas variadas, umidade e concentração de sal, combinada com a sua capacidade para formar biofilmes e a sua resistência às práticas de limpeza e desinfecção de rotina, o torna um desafio significativo e contínuo para a indústria de alimentos (TODOROV, 2018).

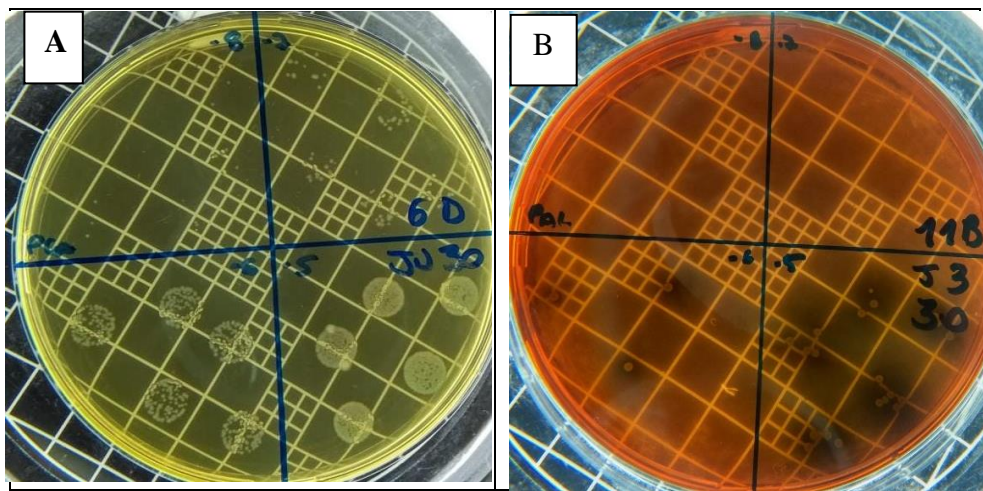
As observações conflitantes sobre a formação dos biofilmes podem ser reflexo das diferentes superfícies e cepas analisadas, como também as condições experimentais aplicadas nos estudos. Isso também pode ser uma indicação da diversidade de respostas exibido por diferentes grupos bacterianos.

A capacidade de *L. monocytogenes* para formar um biofilme é dependente do sorotipo, temperatura, nível de nutrientes, exposição prévia a estressores ácido e da topografia e composição da superfície (BONSAGLIA et al., 2014; BARBOSA et al., 2013; MOSQUERA-FERNANDEZ et al., 2018).

Contagem de células

O plaqueamento foi feito pelo método de *drop plate* em triplicata em meios BHI e Palcam, incubados a 37 °C por 24 horas. A eficácia de cada BAL contra *L. monocytogenes* foi avaliada pela diferença entre o número de unidades formadoras de colônias de bactérias. Na Figura 7 é possível observar a técnica de gotas para cada bactéria de estudo, onde foi possível a realização da contagem apenas na diluição 10⁻⁵.

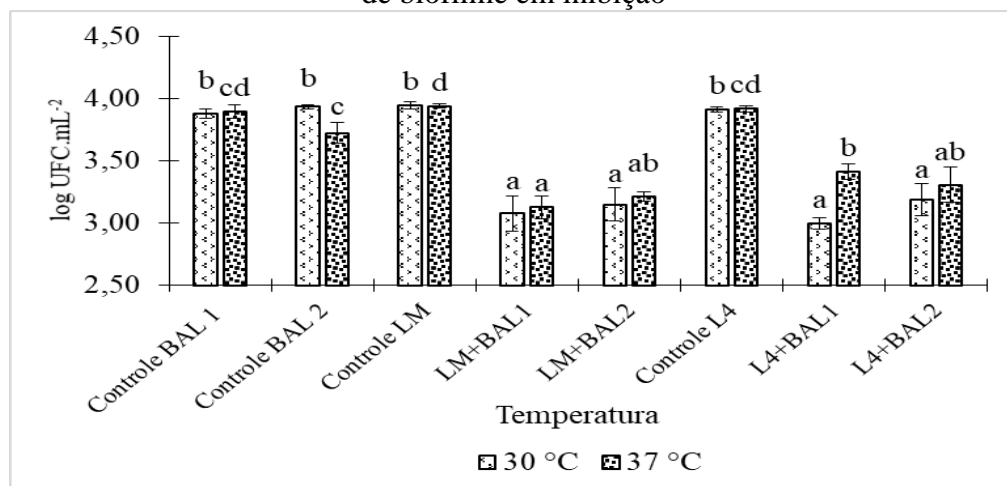
Figura 7 - Procedimento de contagem pelo método de drop plate. (A) BAL, (B) *L. monocytogenes*



Fonte: Autoria Própria, 2020.

Assim, de acordo com a figura 8 é possível observar os diferentes valores de unidades formadoras de colônia para cada bactéria de estudo. Esses valores foram usados de forma a padronizar todos os inóculos utilizados durante os experimentos com as bactérias de estudo para formação de biofilmes.

Figura 8 – Quantificação em log¹⁰ UFC ml⁻² em diferentes temperaturas quanto a formação de biofilme em inibição



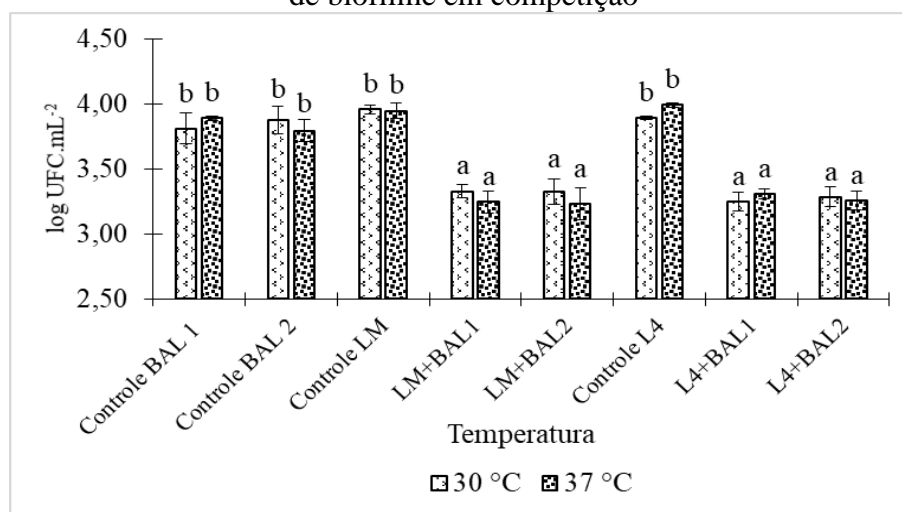
Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria Pópria, 2020.

A partir do crescimento nas placas, foi realizada a contagem das UFC e os resultados foram expressos em valores Log_{10} UFC/ml.

Observou-se no resultado que a temperatura de 37°C apresentou um número maior no Log em comparação a 30°C .

Figura 9 – Quantificação em log^{10} UFC ml^{-2} em diferentes temperaturas quanto a formação de biofilme em competição



Legenda: As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A letra (a) é referente ao teste das BAL's e Listerias e (b) aos controles.

Fonte: Autoria Própria, 2020.

Observando os resultados de competições das BAL's com as Listerias, apresentaram resultados diferente ao teste de inibição, pois a temperatura de 30°C apresentou maior Log, mas não obteve tanta diferença significativa.

As BALs testadas reduziram em relação a concentração inicial para as cepas de *L. monocytogenes*, porém não suficiente para reduzir uma grande camada de biofilme, não atingindo a redução de 5 Log. *L. monocytogenes* é considerada um dos patógenos de origem alimentar mais importante na atualidade, principalmente na indústria alimentícia, pela sua capacidade de contaminar ambientes, de processamento de alimentos, com grande possibilidades de formar biofilme em utensílios, equipamentos, pisos e drenos, atingindo produtos finais por contaminação cruzada (CAMARGO; WOODWARD; CALL; NERO, 2017).

Segundo Andrade e colaboradores, (2008) para ser considerado um biofilme, é necessário apresentar um número mínimo de 10^7 UFC/ cm^2 . Este parâmetro é considerado extremamente importante pois o número inicial de microrganismos presente influencia a

formação de biofilme. Shinohara e colaboradores (2018) evidenciam a capacidade de adaptação dos microrganismos mesmo em condições ambientais desfavoráveis.

Sugere-se em trabalhos futuros o estudo da produção de biofilme por BAL's frente a *L. monocytogenes* em diferentes superfícies de contato, como metais e vidros, uma vez que são bastante utilizados na indústria alimentícia e nas residências dos consumidores, respectivamente.

CONCLUSÕES

A *Bifidobacterium animalis* apresentou maior capacidade inibitória sobre *L. monocytogenes* em relação a *Lactobacillus plantarum*. Os ensaios não demonstraram diferença significativa na formação e remoção do biofilme pré-formado nos temperatura de 30 °C e 37 °C.

REFERÊNCIAS

CAMARGO, A.C; DE PAULA, O.A; TODOROV, S.D; NERO, L.A. In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Appl Biochem Biotechnol**, 2016.

CEZAR, Vanessa Danesi dos Santos et al. Susceptibilidade de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em produtos lácteos no Rio Grande do Sul frente a diferentes desinfetantes. **Revista FASEN Ciências**, v.3, p. 100-111, Jan. /Jun. de 2013.

DIAS, Denise de Almeida Marques. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2008. 84 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DOIJAD, S.P; BARBUDDHE, S.B; GARG, S; POHARKAR, K.V; KALOVERY, D.R; KURKURE, N.V., et al. Habilidades de formação de biofilme de sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados de diferentes fontes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>.

FERREIRA, V; WIEDMANN, M; TEIXEIRA, P; STASIEWICZ, M.J. *Listeria monocytogenes* persistência em ambientes associados a alimentos: epidemiologia, características de estirpes e implicações para a saúde pública. **J Food Prot**, v. 77, p. 150 – 170, 2014.

GEHLEN, S.S. **Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies por *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização**. Dissertação: em Ciências Veterinárias na Área de Sanidade Avícola. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2016.

GÓMEZ, N.C et al. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. **Front in Microb**, 2016.

GONG, C; JIANG, X. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. **Poultry Sci**, v. 0, p. 1–11, 2017.

MANTO, L. **Ação in vitro de bactérias ácido lácticas frente a *Salmonella Heidelberg* multipresente e formadora de biofilmes**. Universidade de Passo Fundo, 2019.

RODRIGUES, L.B. **Avaliação da formação de biofilmes e das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de cortes de matadouro de aves**. [Tese] PortoAlegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

RODRÍGUEZ, A; MEDINA, Á; CÓRDOBA, J.J; MAGAN, N. The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, p. 113-119, 2014.

STEPANOVIC, S; IRKOVIC, I.C; RANIN, L; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett in App Microb**, v. 38, p. 428–432, 2004.

TODOROV, D. S; OTÁVIO, A.L. et al. Efecto combinado de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* ST8SH y la vancomicina, el própolis o el EDTA para controlar o desenvolvimiento do biofilme producido por *Listeria monocytogenes*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, p. 48-55, 2018.