

## **FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM POLIPROPILENO POR BACTÉRIAS DE INTERESSE EM ALIMENTOS**

Ingrid Garcia de Araujo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jane Martha Graton Mikcha (Orientador), e-mail: ingridgarciaaraujo@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

**Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Microbiologia de Alimentos**

**Palavras-chave:** Biofilmes, polipropileno, alimentos.

### **Resumo:**

Biofilmes bacterianos são constantemente prejudiciais nas indústrias alimentícias, visto que podem ser formados por micro-organismos patogênicos e deteriorantes capazes de contaminar os alimentos. Este trabalho avaliou a formação de biofilme por *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* em polipropileno. As culturas bacterianas foram inoculadas em microtubos contendo cupons de polipropileno e após 48h a 35 °C foi realizada a contagem de células viáveis do biofilme formado e os resultados expresso em  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>. Todas as bactérias avaliadas foram capazes de formar biofilme em polipropileno. As contagens variaram entre 6,36 e 9,33 UFC/cm<sup>2</sup>. A bactéria com maior capacidade de formação de biofilme em polipropileno foi *P. aeruginosa*.

### **Introdução**

A contaminação dos alimentos por micro-organismos é uma preocupação para a indústria de alimentos, para os consumidores e para a saúde pública, e gera prejuízos econômicos, sociais e ambientais. Várias são as fontes de contaminação no ambiente de processamento de alimentos, entre elas, as superfícies utilizadas para seu preparo. A capacidade dos micro-organismos aderir e formar biofilmes nestas superfícies contribui para a contaminação (BRIDIER et al. 2015).

Biofilmes correspondem a comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos - EPS), em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. (DONLAN; COSTERTON, 2002). Além dos biofilmes serem uma fonte contínua de contaminação, uma das principais características das células em biofilme é a resistência aos agentes desinfetantes.

Vários micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos tem capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies, entre elas o polipropileno que é comumente utilizado nos ambientes de processamento de alimentos (BRIDIER et al. 2015).

Neste estudo foi avaliada a capacidade de formação de biofilme por bactérias de importância na área de alimentos: *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* em superfície de polipropileno.

## **Materiais e métodos**

### *Isolados bacterianos*

Foram utilizados no estudo *Escherichia coli* ATCC 25922, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7960, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Bacillus cereus* ATCC 14579. Os isolados bacterianos estavam estocados a -20 °C em caldo *Brain and Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerina e em meio ágar nutriente sob refrigeração no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os isolados bacterianos foram transferidos para caldo BHI e incubados a 35 °C por 24h. Após, foi realizada a semeadura em ágar Hektoen enteric (HE) para *A. hydrophila* e *P. aeruginosa*, ágar Eosina Azul de Metileno (EMB AGAR) para *E. coli*, e ágar sangue (AS) para *B. cereus* e as placas foram incubadas a 35 °C por 24h.

### *Formação do biofilme*

Inicialmente para a formação do biofilme em polipropileno foi realizada a cultura *overnight* a partir das placas de *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *B. cereus* em *Tryptic Soy Broth* (TSB) a 35 °C. Posteriormente, a cultura foi diluída no mesmo meio de cultura para obter  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> e colocada em microtubos contendo cupons de polipropileno (1mm x 8mm x 8mm) que foram previamente higienizados e esterilizados. Os microtubos foram incubados por 24 h a 35 °C, o conteúdo foi substituído por novo TSB, e foram incubados novamente nas mesmas condições. Após as 48 h de incubação, os cupons foram lavados com solução salina 0,85%, e nova solução salina 0,85% foi acrescentada aos microtubos que posteriormente foram submetidos ao ultrassom a 25 Hz por 5 minutos (Ultra Cleaner 750 A, Unique). Foram realizadas diluições seriadas em solução salina 0,85%, semeadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA), e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em UFC cm<sup>-2</sup>. O experimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes.

## Resultados e Discussão

Foi avaliada a formação de biofilme por *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *B. cereus*. Observou-se a formação de biofilme em superfície de polipropileno por todas as bactérias avaliadas. O número de células viáveis recuperadas do polipropileno está apresentado na tabela 1.

**Tabela 1:** Formação de biofilme por *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* em superfície de polipropileno.

Bactérias	Log <sub>10</sub> UFC/cm <sup>2</sup>
<i>Escherichia coli</i>	8.14
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6.36
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.33
<i>Bacillus cereus</i>	6.18

Esses resultados são semelhantes aos obtidos nos estudos de Costa et al. (2016) e Bae e Lee (2012) em que *P. aeruginosa* apresentou contagem de 7.32 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e 8,02 log<sub>10</sub> CFU/cupon na mesma superfície. Assim como Bergamin et al. (2015) classificaram *P. aeruginosa* e *A. hydrophila* como fortes formadoras de biofilme devido à alta capacidade de aderência em polipropileno, em que *A. hydrophila* teve crescimento de 6,6 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e *P. aeruginosa* 7,9 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>. Kim et al. (2015) recuperaram aproximadamente 8 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli* a partir de biofilmes em polipropileno. Fernandes et al. (2017) avaliaram biofilme de *B. cereus* em aço a 25 °C e 39 °C e obtiveram contagem de células viáveis menores que as do presente estudo: 4.05 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> e 3.55 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

## Conclusões

Houve formação de biofilme em superfície de polipropileno por *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* e *B. cereus*, sendo *P. aeruginosa* a bactéria que apresentou maior contagem de células viáveis entre as bactérias analisadas. Visto que os biofilmes podem ser fonte de contaminação e que as espécies avaliadas podem ser patogênicas e também causar deterioração de alimentos, os resultados reforçam a necessidade de medidas de controle de biofilmes bacterianos.

## Agradecimentos

Ao CNPq.

## Referências

BAE Y.M.; LEE SY. **Inhibitory effects of UV treatment and a combination of UV and dry heat against pathogens on stainless steel and polypropylene surfaces.** Journal of Food Science, v. 77(1), 2012.

BERGAMIN S.R.; SCHUH V.; COSTA K.D.; RIBEIROS M.L.; SILVEIRA S.M.; MILLEZI A.S. **Capacidade de formação de biofilmes por diferentes bactérias patogênicas.** Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar - Câmpus Santa Rosa do Sul. 2015.

BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M.; PIARD, J.C.; NAITALI, M.; BRIANDET, R. **Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens.** Food Microbiology, v. 45, p. 167-178, 2015.

COSTA, K. A. D.; FERENZ, M.; SILVEIRA S.M.; MILLEZI A.S. **Formação de Biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústria de alimentos.** Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 75-82, abr/jun, 2016. Disponível em <  
<https://www.revistadoilct.com.br/riict/article/viewFile/512/405>> Acesso em: 25 de julho de 2017.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.** Clinical Microbiology Reviews, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

FERNANDES, M.S.; ALVARES, A. C.; MANOEL, J. G. M.; ESPER, L. M. R.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. **Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical sanitation procedures.** Internation Dairy Journal, v. 72, p. 23-28, 2017.

KIM H.J.; JAYASENA D.D.; YONG H.; PARK S.; PARK J.; CHOE W.; JO C.; ALAHAKOON A.U. **Effect of atmospheric pressure plasma jet on the foodborne pathogens attached to commercial food containers.** Journal of Food Science and Technology, v. 52, p. 8410–8415, 2015.