

BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS E A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO

Giovana Andrade Gubolin (PIC/UEM), Daliah Alves Coisas Trevisan (Co-autor), Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá (Orientador), Jane Martha Graton Mikcha (Co-orientadora), email: giovanagubolin@gmail.com

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

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Microbiologia de Alimentos

Palavras-chave: biofilme, aço, bactérias.

Resumo:

Os microrganismos podem causar graves danos à saúde das pessoas e também serem grandes problemas para as indústrias de alimentos. Estes podem estar presentes nas superfícies usadas para manipulação, armazenamento e processamento de alimentos em forma de biofilme. As bactérias quando encontradas em biofilme apresentam maior resistência a tratamentos antimicrobianos. Dessa forma, esse trabalho tem por objetivo avaliar a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* na superfície de aço, para posterior estudo de formas de controle dos mesmos na produção das indústrias alimentícias. A formação de biofilme em aço foi obtida para *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com a contagem do número de células bacterianas aderidas variando entre 5,72 a 7,14 log UFC/cm², demonstrando que os mesmos possuem capacidade de formar biofilme em superfície aço à 35°C.

Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são um dos mais recorrentes problemas de saúde pública. As DTAs têm como principal origem os microrganismos que contaminam os alimentos e, através da ingestão destes, podem levar a graves eventos patológicos no organismo humano (NOTERMANS et al., 1992). Além dos problemas de saúde dos consumidores, os microrganismos também podem deteriorar alimentos, ocasionando grandes perdas para as indústrias alimentícias. Dentre os contaminantes mais importantes encontrados nos alimentos estão

Salmonella spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As bactérias normalmente existem em dois estados, como células planctônicas, que existem livremente em grandes quantidades, ou aderidas a uma superfície, fazendo parte de um biofilme. Os biofilmes são comunidades de células que buscam estratégias de sobrevivência em ambientes com condições adversas. As células se aderem a superfícies sólidas com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares que protegem e imobilizam as células (COSTERTON et al., 1999).

As superfícies que são usadas para manipulação, armazenamento e processamento de alimentos são importantes fontes de contaminação por microrganismos, uma vez que, a transmissão de patógenos na forma de biofilmes aos alimentos pode ocorrer (BARNES et al., 1999).

Para as indústrias alimentícias, a formação desses biofilmes é de grande risco para a deterioração dos produtos, corrosões, contaminação dos alimentos, redução da eficiência de produção, obstrução da tubulação e falha de equipamento.

Portanto, o conhecimento das condições necessárias para a formação de biofilme de bactérias de importância em alimentos é valioso para uma avaliação futura de medidas de controle desses biofilmes na produção de alimentos e assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* em aço.

Materiais e métodos

Microorganismos testados e preparo do inóculo

Foi utilizado para o experimento *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *A. hydrophila* ATCC 7960 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 obtidas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UEM e estocadas em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (Difco™) com 20% de glicerol a -20 °C. Antes do uso uma alíquota dos microrganismos congelados foram transferidos para caldo BHI (TSB) (Difco™) e incubados por 24 horas a 35 °C. Posteriormente, cada espécie bacteriana foi semeada em placas com meio seletivo e diferencial incubada a 35°C por 24 – 48 horas para observação das características do crescimento e da pureza do mesmo.

Formação de Biofilme em superfície de aço

Os isolados bacterianos foram cultivados em Tryptic Soy Broth (TSB - Merck, Darmstadt, Germany) a 35°C *overnight* e para se obter 10^7 UFC/mL, confirmado pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas de Hektoen e Baird Parker, para *E. coli*, *A. hydrophila* e *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente.

Foram adicionados 1500 µL do cultivo bacteriano em microtubos que continham cupons de aço (1x7x7 mm), previamente higienizados e esterilizados em autoclave. Os microtubos foram incubados a 35 °C durante

24 h, e os conteúdos cuidadosamente substituídos por novo TSB e incubados durante mais 24 h a 35 °C. Após a incubação, os conteúdos dos microtubos foram aspirados e os cupons lavados com solução salina estéril a 0,85%. Posteriormente, 1500 µL de uma solução salina estéril a 0,85% foi adicionada, e os cupons submetidos a um banho de ultra-som a 25 kHz durante 5 min (Ultra Cleaner 750A, Unique). Foram realizadas diluições em série em solução salina estéril a 0,85%, plaqueadas em ágar de Mueller Hinton (MHA; Difco) e incubadas a 37 °C durante 24 h. As UFCs foram contadas e os resultados foram expressos como log UFC/cm². Os testes foram realizados em triplicata, em quatro diferentes experimentos.

Resultados e Discussão

A formação de biofilme em aço foi obtida para *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Conforme mostra a Tabela 1, a contagem do número de células bacterianas aderidas ao aço após 48 horas variou entre 5,72 a 7,14 log UFC/cm². Dessa forma, foi possível observar que quando esses microrganismos são expostos à superfície de aço na temperatura de 35°C, os mesmos apresentaram capacidade de formação de biofilme.

Tabela 1: Células bacterianas viáveis em biofilme nas superfícies de aço

Bactéria	log/UFC/cm ²
<i>A. hydrophila</i>	5,77
<i>E. coli</i>	7,14
<i>P. aeruginosa</i>	6,87
<i>S. aureus</i>	5,72

Os resultados obtidos são semelhantes aos anteriormente descritos por (BOARI et al., 2009) e (CAMPANA et al., 2018) que obtiveram valores de aproximadamente 5 log/UFC/cm² para *A. hydrophila*, 6,6 log/UFC/cm² *E. coli*; 7 log/UFC/cm² para *P. aeruginosa* e 5 log/UFC/cm² para *S. aureus*.

Conclusões

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* possuem capacidade de formar biofilme em superfície aço à 35°C.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, amigos, companheiros do laboratório, e especialmente, à minha orientadora Prof^a Dr^a Paula que me deu todo apoio e suporte necessário para a realização desse trabalho.

Referências

BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, A. H. L. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, 65, 4543–4548.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. (2009). Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 29(4): 886-895.

CAMPANA, R.; CIANDRINI, E.; BAFFONE, W. (2018). Experimental approach for a possible integrated protocol to determine sanitizer activity against both planktonic bacteria and related biofilms. **Food Research International**, Volume 111: 472-479.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, 284 (5418): 1318-22.

NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. H. (1992). Existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, 15(3-4): 197-205.