

FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *ALICYCLOBACILLUS* SPP. EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL COM DIFERENTES ACABAMENTOS INDUSTRIAL USADOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Gabriel Augusto Teixeira Becel (PIC/Uem), Benício Alves de Abreu Filho
(Orientador), e-mail: baafilho@uem.br

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

Ciência de Alimentos – Microbiologia de Alimentos

Palavras-chave: *Alicyclobacillus*, microbiologia de alimentos, suco de laranja

Resumo:

Alicyclobacillus spp. é uma bactéria esporulada, acido-termorresistente e que frequentemente está associada à deterioração de sucos de laranja, além disso, estes micro-organismos podem estar presentes em indústria processadora de suco de laranja através de biofilmes em superfícies que contatam diretamente com o suco, como o aço inoxidável. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a formação de biofilme em duas superfícies diferentes de aço inoxidável, com cepas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus herbarius* e *Alicyclobacillus sendaiensis* utilizando o suco de laranja reconstituído como substrato. Foi observado a formação de biofilme das três espécies descritas. Este estudo demonstra que a adesão de células nos cupons do tipo liso e rugoso tiveram números equivalentes, onde não apresentaram diferenças significantes dentre as respectivas espécies.

Introdução

A. acidoterrestris podem estar presentes na indústria alimentar e formar biofilmes, que são comunidades estruturadas de micro-organismos que produzem uma matriz de compostos poliméricos extracelulares aderidos entre si e/ou a uma superfície ou interface (Anjos et al., 2013). Em 1912, foi descoberta a superfície de aço inoxidável, assim a sua funcionalidade que ela resistia ao ataque químico de vários reagentes. Por esse motivo identificou-se esta liga, chamando-a de “stainless steel” que significa “aço que não mancha” e a tradução “inoxidável” que permite aplicá-los em superfícies industriais. O uso dos aços inoxidáveis tem crescido atualmente por possuir diferentes propriedades e aplicações. As mais importantes entre elas são sem dúvida a excelente resistência à oxidação em diversos meios (Toledo Júnior, Castro & Oliveira, 2015). Entretanto, não se tem conhecimento de estudos comparando os acabamentos superfícies de aço inoxidável na formação de biofilme de *Alicyclobacillus* spp. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar a formação de biofilmes comparando os acabamentos superficiais de aço inoxidável

AISI 304 (acabamento 4 e 6) na formação de biofilme de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus herbarius* e *Alicyclobacillus sendaiensis*.

Materiais e métodos

Obtenção das linhagens microbianas

As cepas utilizadas no trabalho foram adquiridas da Coleção de Culturas Alemã de Micro-organismos e Culturas Celulares (DSMZ - Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen), Korea Collection for Type Culture (KCTC) e da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA / UNICAMP. As cepas estão depositadas em nosso laboratório: Laboratório de microbiologia de Água, ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá.

A. acidoterrestris DSMZ 3922T - (CBMAI: 0244T) – Origem: Solo.

A. herbarius DSMZ 13609T - (CBMAI: 0246T) – Origem: Chá-de-erva.

A. sendaiensis KCTC 3843 - Korea Collection for Type Culture (KCTC) - Origem: Solo.

Avaliação da formação de biofilmes

a) Preparo dos cupons de aço inoxidável: A formação de biofilme bacteriano foi avaliada em cupons de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4 e 6 (0,8 x 0,8 cm x 1 mm). Antes de cada ensaio, os cupons foram lavados com detergente neutro, enxaguados com água destilada, imersos em álcool 70% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente, enxaguados novamente em água destilada e esterilizados a 121 °C por 15-20 min (Fernandes et al., 2014).

b) Preparo do meio de cultivo: O suco de laranja concentrado 66 °Brix foi utilizado como meio de cultivo. Este suco foi reconstituído em água estéril para 11 °Brix. As amostras foram previamente certificadas da ausência de células vegetativas e esporos de *Alicyclobacillus* spp.

c) Avaliação da formação de biofilme (células sésseis): Para cada cepa foi preparada a suspensão bacteriana em solução salina a 0,85% para obter uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mc Farland. Em seguida, foram realizadas as diluições decimais seriadas de cada espécie até a obtenção de suspensão de aproximadamente 1×10^5 UFC/ml. Os cupons teste foram imersos assepticamente em poços de placas estéreis de poliestireno para cultura de células, com 24 poços e fundo chato contendo 1 ml de suco de laranja inoculados com aproximadamente 10^5 UFC/ml da cepa de *Alicyclobacillus* spp. Assim, foram realizados três experimentos independentes. Posteriormente, as placas foram incubadas na temperatura de 45 °C para as espécies *A. acidoterrestris*, *A. herbarius* e *A. sendaiensis*. As análises da formação de biofilme foram realizadas após 72 h.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após 72h de formação de incubação do *A. acidoterrestris*, os cupons foram tratados com cocodilato e glutaraldeído 2,5% para fixação, seguido de desidratação com álcool etílico, ponto crítico com CO₂ e metalização com ouro. Os cupons foram observados em MEV (Quanta 250 FEI).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e os valores das médias foram comparados por teste de Tukey a $p < 0,05$. A análise estatística foi conduzida utilizando o programa SISVAR versão 5.3.

Resultados e Discussão

Comparando os tipos de cupons de aço, entre o liso e o rugoso, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na formação do biofilme entre os mesmos tipos de cepas bacterianas, utilizando o suco de laranja diluído como substrato, como mostra a Tabela 1. Em relação a recuperação das células sésseis, observa-se que *A. herbarius* apresenta uma maior contagem na formação de biofilme.

Tabela 1. Contagem $\pm$ DP de células sésseis (log UFC/cm²) de *Alicyclobacillus* spp.

Cepa/Tipo de aço	<i>A. sendaiensis</i>	<i>A. herbarius</i>	<i>A. acidoterrestris</i>
Rugoso	3,88 ^a $\pm$ 0,061	6,99 ^a $\pm$ 0,173	4,22 ^a $\pm$ 0,577
Liso	3,71 ^a $\pm$ 0,299	7,05 ^a $\pm$ 0,237	4,46 ^a $\pm$ 0,513

Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey à 5%.

A Figura 1 apresenta as imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura, em que mostra a formação do biofilme das células de *A. acidoterrestris* nas duas superfícies de aço inoxidável após 72h de contato.

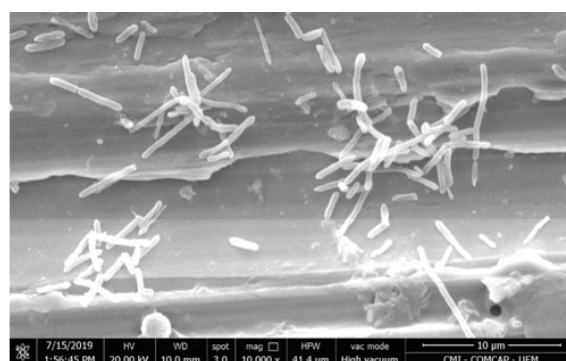
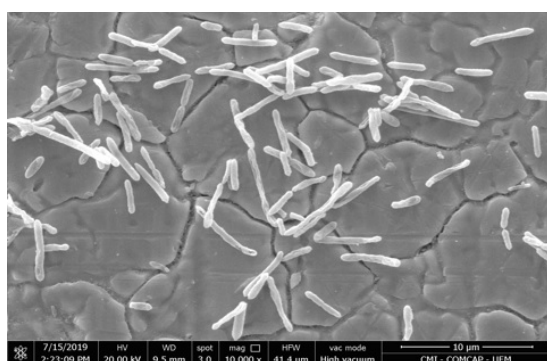


Figura 1 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme na superfície rugosa (A) e superfície lisa (B) dos cupons de aço por cepas de *A. acidoterrestris*, após a incubação a 45 °C por 72h.

Como visto na Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 1), a superfície lisa ainda apresenta algumas rugosidades, o que pode contribuir para que não haja diferença significativa na formação do biofilme pelas cepas. Além disso, vários fatores podem influenciar na adesão inicial do micro-organismo à superfície dos materiais e na

formação do biofilme, dentre elas a carga elétrica superficial do micro-organismo e da superfície, os genes ativos de cada cepa para produção de exopolissacarídeo, entre outros.

Conclusões

No presente estudo, foi possível observar a formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável AISI 304 tanto no acabamento do tipo liso quanto no tipo rugoso por *A. acidoterrestris*, *A. sendaiensis* e *A. herbarius*. Observou-se também que não houve diferença significativa na formação de biofilme da mesma espécie dentre os dois tipos de aço inoxidável utilizados.

Agradecimentos

Agradeço a UEM pela oportunidade do PIC, a equipe do Laboratório de Microbiologia do Ambiente, da Água e Alimentos pela estrutura e auxílio.

Referências

ANJOS, M. M., RUIZ, S. P., NAKAMURA, C. V, ABREU FILHO, B. A. The resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores and biofilm to industrial sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 76, p.1408-1413, 2013.

CIUFFREDA, E., BEVILACQUA, A., SINIGAGLIA, M., CORBO, M.R. *Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality Through New Approaches. **Microorganisms**, 3(4), 625-640, 2015.

FERNANDES, M. S., FUJIMOTO, G., SCHNEID, I., KABUKI, D. Y., KUAYE, A. Y. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. **International Dairy Journal**, 38, 16-23, 2014.

TEIXEIRA, L.A., FIGUEIREDO, A.M.S., FERREIRA, B.T. ALVES, V.M.L., NAGAO, P.E., ALVIANO, C.S., ANGLUSTER, J., SILVA-FILHO, F.C., BENCHETRIT, L.C. Sialic acid content and surface hydrophobicity of group B streptococci. **Epidemiol. Infect.** 110, 87-94, 1993.