



## FORMAÇÃO DE BIOFILME SECO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SUPERFÍCIES ABIÓTICAS

**Palavras-Chave:** SEGURANÇA DE ALIMENTOS, BIOFILME, *LISTERIA*

**Autoras:**

**JOANA RODRIGUES CERQUEIRA ZIOLI FERNANDES, FEA – UNICAMP**

**THÁIS HELENA DE CAMARGO, FEA – UNICAMP**

**RAUL FERNANDO PEREIRA, FEA – UNICAMP**

**Dr<sup>a</sup>. JÉSSICA DE ARAGÃO FREIRE FERREIRA FINGER (coorientadora), FEA – UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO (orientadora), FEA – UNICAMP**

---

### INTRODUÇÃO:

Biofilmes são comunidades microbianas, desenvolvidas e aderidas em uma superfície ou solução, onde as células podem ou não estar envoltas por substâncias poliméricas extracelulares (EPS, Pinto *et al.*, 2020). Os biofilmes possuem alto potencial de disseminação e sobrevivência em condições adversas, uma vez que sua formação é adaptável ao ambiente (Sharan *et al.*, 2022). Fatores como a cepa bacteriana, o tipo de superfície, mobilidade das células e condições ambientais podem influenciar o processo de adesão bacteriana (Mgomi *et al.*, 2022). Dessa forma, os microrganismos conseguem persistir em diversos ambientes, incluindo superfícies secas (*dry surface biofilms* - DSB), que ainda representam um grande desafio para o controle sanitário. Parte desse biofilme pode entrar em estado de dormência, ou seja, células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC, Viable But Non-Culturable), o que apresenta desafios na detecção e eliminação desses microrganismos (Sadiq *et al.*, 2023).

No contexto da indústria de alimentos, a presença de múltiplos patógenos formadores de biofilme representa um risco tanto para a segurança de alimentos quanto para os aspectos econômicos. Esses biofilmes apresentam maior resistência aos métodos tradicionais de higienização, dificultando a sua remoção completa (Elafify *et al.*, 2024). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a ingestão de alimentos contaminados seja responsável pela morte de milhares de pessoas anualmente (WHO, 2017). No Brasil, entre 2014 e 2023, foram notificados 6.874 surtos de origem alimentar, que resultaram em 110.614 doentes e 121 óbitos (Brasil, 2024).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, patogênica e frequentemente associada a surtos na indústria alimentícia, representando um risco significativo, especialmente para grupos vulneráveis (EFSA, 2018). Essa bactéria é capaz de se desenvolver em uma ampla variedade de ambientes, tolerando diferentes condições de atividade de água, temperatura e pH (Finn *et al.*, 2023).

Compreender os mecanismos de formação de biofilmes secos por *Listeria monocytogenes* é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e controle. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação e persistência de DSB de *Listeria monocytogenes* em superfícies abióticas, além de investigar a presença de células no estado VBNC.

## **METODOLOGIA:**

Este estudo avaliou dois protocolos para formação de DSB: P1, com fase úmida e seca com duração de 48 h e P2 com fase úmida de 24 h e seca de 120 h. A metodologia da formação do DSB foi adaptada de Ledwoch *et al.* (2019).

### **Origem dos isolados e preparo do inóculo**

As cepas de *L. monocytogenes* utilizadas foram SCOTT A, ATCC 19111 e ATCC 7644, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Higiene e Legislação da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp. Para ativar as cepas, uma pérola de vidro foi transferida para 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, EUA) e incubada a 37 °C por 18 a 24 h. Após o período de incubação, foram estriadas em placas de TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco, EUA) suplementado com YE (*Yeast Extract*, Neogen, EUA) e incubadas nas mesmas condições supracitadas. Então, o inóculo foi preparado usando escala de *McFarland* de 0,5, com o auxílio do *Densimat Densimeter* (Biomerieux). O pool foi preparado homogeneizando-se 1 mL da suspensão de cada cepa em TSB-YE (*Tryptic Soy Broth*, Neogen, EUA + *Yeast Extract*, Neogen, EUA), resultando em uma população final de aproximadamente 6 log UFC/mL.

### **Formação do biofilme nos cupons**

Cupons de 1 cm<sup>2</sup> de aço inoxidável (AI) e polipropileno (PP) foram organizados em uma placa de fundo chato de 24 poços e inoculados com 1 mL do pool de cepas em TSB-YE. Em seguida, os cupons foram mantidos sob agitação suave e temperatura ambiente, correspondendo à primeira fase úmida. Posteriormente, o caldo foi drenado dos poços e as placas foram incubadas a 25 °C, correspondendo à primeira fase seca. Esse ciclo foi repetido duas vezes, para os dois protocolos. No entanto, na segunda fase úmida os cupons foram reidratados com 1 mL de TSB-YE estéril.

### **Quantificação do biofilme**

Após a finalização dos dois ciclos, foi realizada a quantificação dos biofilmes no dia zero e cada 14 dias até o dia 42, resultando em 4 pontos de quantificação 0, 14, 28 e 42 dias. Para isso, um cupom de cada tipo de superfície e protocolo foi retirado da placa e transferido para solução salina 0,85%, visando remoção das células não aderidas. Em seguida, os cupons foram transferidos para tubos contendo solução salina e 10 pérolas de vidro, e submetidos à agitação em vortex para a remoção das células aderidas cultiváveis (adaptado de Ziech *et al.*, 2016). Posteriormente, foram feitas diluições seriadas em água peptonada 0,1%. Por fim, as amostras foram plaqueadas por superfície (0,1 mL) em

Oxford *Listeria Agar Base* (OXA, Neogen, EUA), suplementado com *Oxford Supplement* (Neogen, EUA). Em paralelo, 1 mL da solução salina com pérolas (após a remoção das células) foi transferido para um tubo contendo 1 mL de catalase de fígado bovino (Merck KGaA, Alemanha). Após incubação a 37 °C por 6 h, foi feito o plaqueamento em OXA a 37 °C por 24 h, para determinação das células aderidas viáveis. Os resultados foram expressos em log UFC/cm<sup>2</sup>. Foram realizadas três repetições não dependentes para cada ponto.

Para obter os resultados expressos em log UFC/cm<sup>2</sup>, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\log \left( \frac{\text{colônias contadas} \times 10^{\text{diluição}} \times \text{mL remoção células sésseis}}{\text{mL plaqueado} \times \text{área do cupom}} \right) = \log \text{ UFC/cm}^2$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Houve maior formação de DSB de *L. monocytogenes* em PP quando comparado ao AI em ambos os protocolos avaliados. Isso indica uma possível afinidade da bactéria com a superfície de PP.

Além disso, no geral, o protocolo 1 apresentou maiores contagens, indicando que o tempo de restrição hídrica (fase seca) impacta na formação e viabilidade do DSB de *L. monocytogenes*. No P1 as contagens iniciais de CAC foram de 3,9 ± 0,4 e 1,8 ± 0,5 log UFC/cm<sup>2</sup> para PP e AI, respectivamente. Enquanto que CAV, que inclui CAC e as células em estado VBNC, apresentou contagem de 5,0 ± 0,2 UFC/cm<sup>2</sup> para PP e 2,9 ± 0,4 UFC/cm<sup>2</sup> para AI. A contagem de CAC e CAV foram reduzidas abaixo do limite de quantificação após 28 dias em AI e 42 dias em PP (Figura 1).

No P2, as contagens iniciais de CAC foram de 3,1 ± 0,2 log UFC/cm<sup>2</sup> em PP e 1,4 ± 0,0 log UFC/cm<sup>2</sup> em AI, enquanto as de CAV foram 4,1 ± 0,0 log UFC/cm<sup>2</sup> em PP e 1,7 ± 0,2 UFC/cm<sup>2</sup> em AI. Além disso, observa-se que a população do biofilme foi reduzida abaixo do limite de quantificação a partir de 28 dias em ambas as superfícies (Figura 2).

Em todas as condições experimentais avaliadas (protocolo e superfície), as contagens de CAV foram maiores que as de CAC, indicando que parte das células entraram no estado VBNC devido ao estresse dessecativo.

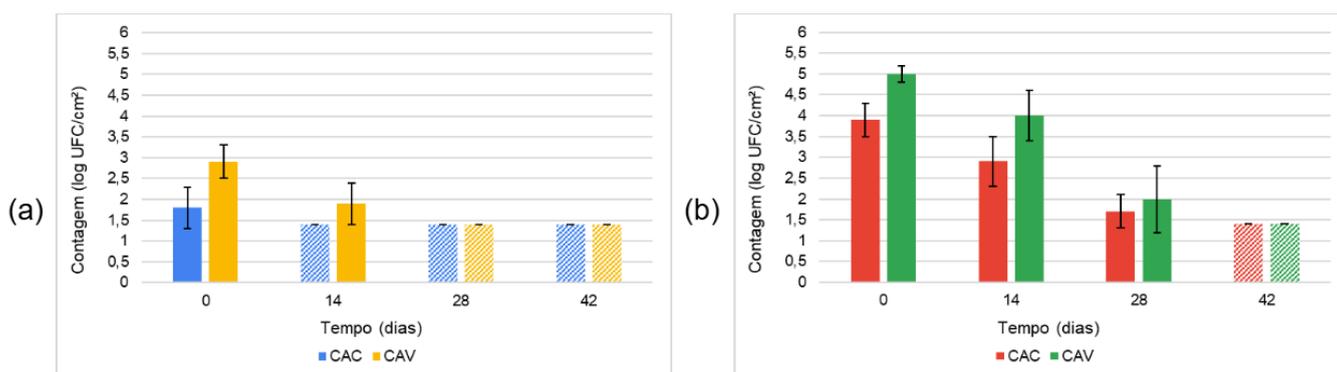


Figura 1 - Viabilidade de biofilme seco (DSB) de *Listeria monocytogenes* (log UFC/cm<sup>2</sup>) utilizando o protocolo P1 para formação (48 h de fase úmida e 48 h de fase seca), em Aço Inoxidável (AI) (a) e Polipropileno (PP) (b) ao longo de 42 dias a 25 °C. CAC: células aderidas cultiváveis. CAV: células aderidas viáveis. As barras chanfradas representam contagens abaixo do limite de quantificação (1,4 log UFC/cm<sup>2</sup>).

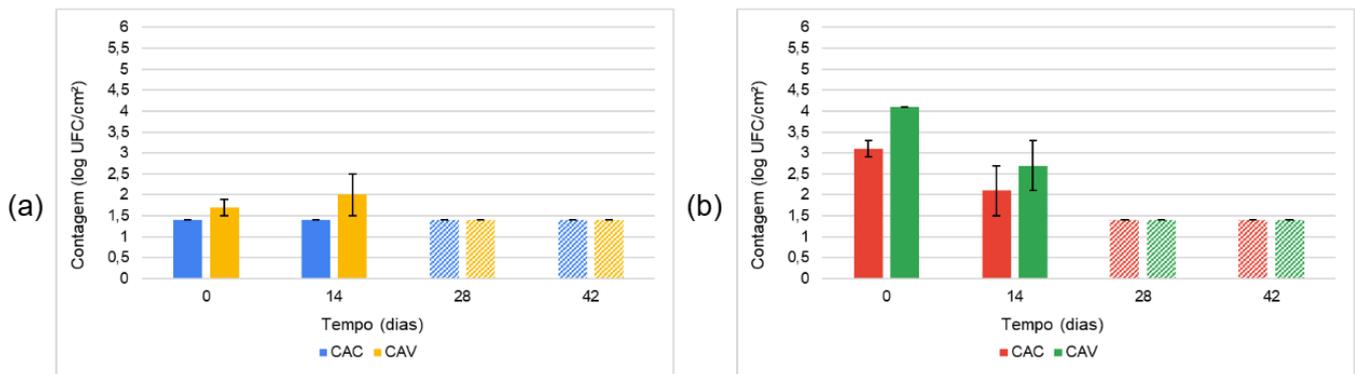


Figura 2 - Viabilidade de biofilme seco (DSB) de *Listeria monocytogenes* (log UFC/cm<sup>2</sup>) utilizando o protocolo P2 para formação (24 h de fase úmida e 120 h de fase seca), em Aço Inoxidável (AI) (a) e Polipropileno (PP) (b) ao longo de 42 dias a 25 °C. CAC: células aderidas cultiváveis. CAV: células aderidas viáveis. As barras chanfradas representam contagens abaixo do limite de quantificação (1,4 log UFC/cm<sup>2</sup>).

## CONCLUSÕES:

*L. monocytogenes* possui maior habilidade de formar DSB em PP, com capacidade de persistir no ambiente fabril por até 28 dias. O tipo de protocolo aplicado e o material da superfície podem afetar o crescimento da bactéria. Além disso, o estresse dessecativo induziu o estado VBNC em parte da população do DSB.

## BIBLIOGRAFIA

- PINTO, R. M. *et al.* Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. 952, p. 1-2, (2020).
- ELAFIFY, Mahmoud; LIAO, Xinyu; FENG, Jinsong; AHN, Juhee; DING, Tian. Biofilm formation in food industries: challenges and control strategies for food safety. **Food Research International**, [S.L.], v. 190, p. 114650, (2024). Elsevier BV.
- SADIQ, F. A. *et al.* Synergistic interactions in multispecies biofilm combinations of bacterial isolates recovered from diverse food processing industries. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 14 (2023)
- MGOMI, F. C. *et al.* Bacteriophages: A weapon against mixed-species biofilms in the food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 4, p.2107-2121, (2022).
- SHARAN, M. *et al.* Biofilms as amicrobial hazard in the food industry: A scoping review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n.4, p. 2210-2234, (2022).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 1 ago. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil – Informe 2024. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024/view>. Acesso em: 1 ago. 2025.
- EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, v. 16, n.12, (2018).

FINN, L.; ONYEAKA, H.; O'NEILL, S. *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Associated Environments: A Persistent Enigma. **Foods**, v. 12, n.18, p. 3339, (2023).

LEDWOCH, K. *et al.* Artificial dry surface biofilm models for testing the efficacy of cleaning and disinfection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68(4), p. 329-336, (2019).

ZIECH, R. *et al.* Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. Isolated from Brazilian poultry processing plants. **LWT - Food Science and Technology**, p.68, (2016).