

FORMAÇÃO DE BIOFILME SECO MULTIESPÉCIES DE *Listeria monocytogenes* E *Enterococcus faecium* EM SUPERFÍCIES ABIÓTICAS

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

Autoras:

THAÍIS HELENA DE CAMARGO, FEA – UNICAMP

JOANA RODRIGUES CERQUEIRA ZIOLI FERNANDES, FEA – UNICAMP

RAUL FERNANDO PEREIRA, FEA – UNICAMP

Dr^a. JÉSSICA DE ARAGÃO FREIRE FERREIRA FINGER (coorientadora), FEA – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO (orientadora), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Biofilmes são comunidades microbianas, mono ou multiespécies, envoltas por uma matriz extracelular polimérica (EPS) e aderidas em uma superfície (Pinto et al., 2020). A população de um biofilme multiespécies promove interações que afetam sua estrutura e função, influenciando na patogenicidade e resultando em dinâmicas complexas de cooperação, competição e comunicação. Os biofilmes de superfície seca, *dry surface biofilms* (DSB), provocam deterioração dos alimentos e propagação de microrganismos patogênicos mesmo em condições de privação de umidade (Mgomi et al., 2022; Sharan et al., 2022).

Listeria monocytogenes é um patógeno bacteriano Gram-positivo envolvido em surtos de doenças de veiculação alimentar, apresentando elevado risco de mortalidade em grupos vulneráveis, que incluem recém-nascidos, idosos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos (EFSA, 2018). Trata-se de uma bactéria ubíqua e capaz de crescer em condições ambientais diversas, como ampla faixa de pH e temperatura, moderada atividade de água e elevada concentração de NaCl (Finn et al., 2023). Estudos estabeleceram que *L. monocytogenes* consegue sobreviver por longos períodos em superfícies alimentícias e não alimentícias, tais como equipamentos e utensílios. A formação do biofilme de *L. monocytogenes* é influenciado pela temperatura, características da superfície de contato e interação com outros microrganismos (Finn et al., 2023).

O gênero *Enterococcus* possui a capacidade de inibir o crescimento de patógenos como a *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, recebendo o status de Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) (Torres et al., 2018). *E. faecium* é comumente encontrada no trato gastrointestinal humano, e em certas condições, pode-se tornar oportunista e causar infecções, principalmente em imunocomprometidos (Torres et al., 2018). *E. faecium* apresenta resistência e capacidade de sobreviver em ambientes estressantes, como condições extremas de temperatura e pH, e alta concentração de NaCl (Ramos et al., 2020). Minei et al. (2008) reportaram a redução da

formação e adesão de biofilme de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecium*, especialmente a cepa produtora de bacteriocina. Isso indica que a produção de bacteriocina por *E. faecium* pode ser uma estratégia de controle de *L. monocytogenes*. Contudo, essa interação é complexa e dependente do ambiente e de outros fatores.

Assim, o objetivo deste estudo foi compreender como ocorre a formação de biofilmes secos multiespécies de *L. monocytogenes* e *E. faecium* em superfícies abióticas, quando expostos a diferentes condições ambientais alternadas, além de avaliar sua resiliência ao longo do tempo.

METODOLOGIA:

Origem dos isolados e preparo do inóculo

Foram utilizadas três cepas de *L. monocytogenes* (Scott A; ATCC 19111 e ATCC 7644) e três cepas de *E. faecium* (122; 109 e 89) presentes no banco de cepas do Laboratório de Higiene e Legislação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As cepas, imobilizadas em pérolas e armazenadas a -80 °C, foram ativadas em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, EUA) e incubadas a 37 °C por 18 a 24 h. Em seguida, foram estriadas em ágar tripticase de soja suplementado com extrato de levedura (TSA-YE, Difco, EUA), e incubadas, novamente, a 37 °C por 18 a 24 h. Os inóculos de cada espécie bacteriana foram preparados em caldo tripticase de soja (TSB, Difco) com um pool das cepas supracitadas até atingir população final de aproximadamente 6 log UFC/mL (Ledwoch et al., 2019).

Formação do biofilme seco e avaliação da viabilidade

Em uma placa de fundo chato, cupons estéreis de 1 cm² de aço inoxidável (AI) e polipropileno (PP) foram dispostos nos poços e inoculados com os pools de cepas de *L. monocytogenes* e *E. faecium*. A formação do biofilme nos cupons foi avaliada em dois protocolos, compostos por alternância de fase úmida e seca, conforme apresentado na Tabela 1. Para cada tratamento foram realizados dois ciclos consecutivos, cada ciclo compreendia uma fase úmida e uma seca.

Tabela 1 - Alternância de fases entre os tratamentos

Protocolo	Fase úmida	Fase seca
T1	48 h	48 h
T2	24 h	120 h

Durante a fase úmida, manteve-se a placa sob agitação constante em temperatura ambiente. Após 24 ou 48 h, o inóculo foi drenado e teve início a fase seca, com incubação em BOD a 25 °C por 48 ou 120 h. Após esse período teve início a segunda fase úmida, com adição de 1 mL de TSB-YE. Então seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente até completar o final da segunda fase seca.

Após o término do segundo ciclo de formação do biofilme, as placas contendo os cupons foram incubadas a 25 °C por 0, 14, 28 e 42 dias. Foram realizados três experimentos independentes para cada protocolo.

Quantificação do biofilme

Para a determinação da população do biofilme, após cada tempo de incubação, um cupom de AI e um de PP foram transferidos para tubos contendo solução salina 0,85%, visando a remoção das células não aderidas. Após 30s, os cupons foram transferidos para tubos contendo solução salina (0,85%) e 10 pérolas de vidro e agitados por 1 min em vórtex para remoção das células aderidas (Ziech et al., 2016). Ao final deste procedimento, 1 ml da solução foi transferido para um tubo contendo água peptonada 0,1%, seguido de diluição seriada e plaqueamento em OXA (*Oxford Listeria Agar Base*, Neogen, EUA) para *L. monocytogenes* e KF (*KF Streptococcus Agar*, Difco, EUA) para *E. faecium*, com incubação a 37 °C por 24 h. Paralelamente, realizou-se a recuperação das células viáveis mas não cultiváveis (VBNC), através da transferência de 1 mL da solução que continha as células aderidas para um tubo com 1 mL de catalase de fígado bovino (Merck KGaA, Alemanha). Após incubação por 6 h a 37 °C, foi realizado o plaqueamento em OXA e KF, como supracitado para determinação das células aderidas viáveis. Os resultados foram expressos em log UFC/cm².

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Figura 1 apresenta a contagem de células aderidas cultiváveis (CAC) e células aderidas viáveis (CAV) de *L. monocytogenes* nas superfícies AI e PP ao longo de 42 dias de incubação a 25 °C para os protocolos T1 e T2. Enquanto na Figura 2, apresenta-se os dados referentes a *E. faecium*. No protocolo 1 (T1), ao término da formação do DBS multiespécies (Tempo 0), a contagem média de células aderidas cultiváveis de *L. monocytogenes* nas duas superfícies, AI e PP, foi de $1,4 \pm 0$ log UFC/cm², enquanto que a contagem média de *E. faecium* foi de $4,7 \pm 0,2$ log UFC/cm² em AI e $5,1 \pm 0$ log UFC/cm² em PP. Já a contagem de CAV de *L. monocytogenes* foi de $1,5 \pm 0,1$ log UFC/cm² em AI e $1,7 \pm 0,4$ log UFC/cm² em PP. Enquanto que a contagem de CAV de *E. faecium* foi de $5,1 \pm 0,9$ log UFC/cm² em AI e $5,3 \pm 0,3$ log UFC/cm² em PP. Após 14 dias, a contagem de *L. monocytogenes* reduziu para abaixo do limite de detecção tanto para CAC quanto para CAV (Figura 1A).

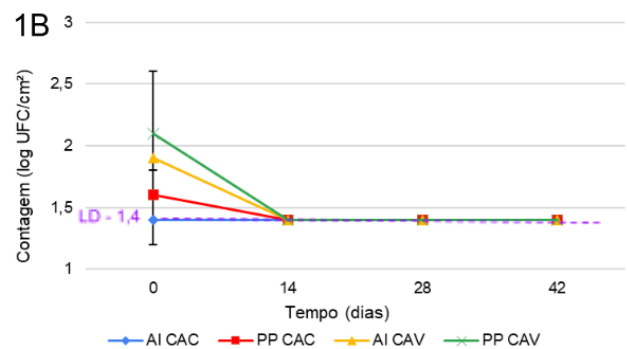
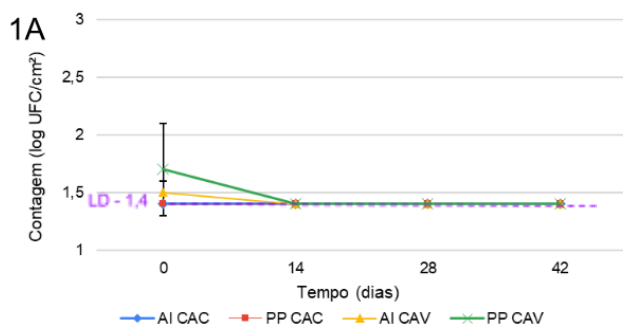


Figura 1 - Contagens da viabilidade de células (log UFC/cm²) aderidas cultiváveis (CAC) e viáveis (CAV) de biofilme seco (DSB) de *L. monocytogenes*. DSB formado em Aço Inoxidável (AI) e Polipropileno (PP) em co cultivo com *E. faecium*. Protocolos do DSB: T1 (fase úmida 48 h / fase seca 48 h) (1A) e T2 (fase úmida 24 h / 120 h fase seca) (1B) ao longo de 42 dias a 25 °C.

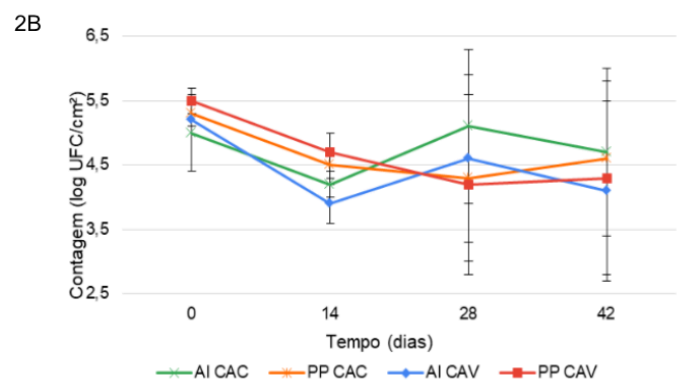
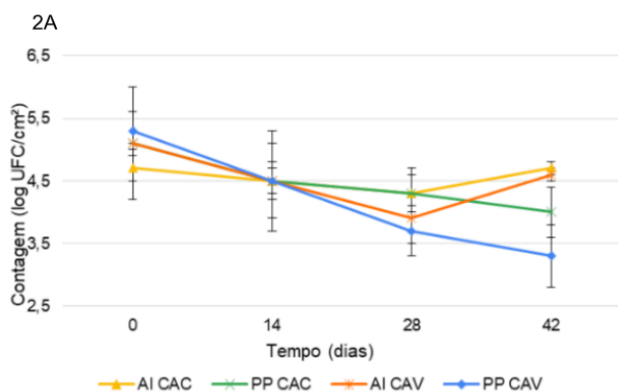


Figura 2 - Contagens da viabilidade de células (log UFC/cm²) aderidas cultiváveis (CAC) e viáveis (CAV) de biofilme seco (DSB) de *E. faecium*. DSB formado em Aço Inoxidável (AI) e Polipropileno (PP) em co cultivo com *L. monocytogenes*. Protocolos do DSB: T1 (fase úmida 48 h / fase seca 48 h) (2A) e T2 (fase úmida 24 h / 120 h fase seca) (2B) ao longo de 42 dias a 25 °C.

Para o *E. faecium*, em AI, as populações de CAC e CAV sofreram pequenas variações ao longo do tempo, com contagens entre $4,3 \pm 0,3$ e $4,7 \pm 0,1$ log UFC/cm² e entre $3,9 \pm 0,4$ e $5,1 \pm 0,9$ log UFC/cm², respectivamente. Para PP, verificou-se redução discreta, com contagem de CAC de $4,0 \pm 0,4$ log UFC/cm² após 42 dias. Para a população de CAV, por sua vez, observou-se redução de 2 log UFC/cm² após 42 dias (Figura 2A).

Para o protocolo 2 (T2), no Tempo 0, as contagens de CAC de *L. monocytogenes* foram de $1,4 \pm 0$ e $1,6 \pm 0,2$ log UFC/cm² para AI e PP, respectivamente. Já as contagens de CAV foram de $1,9 \pm 0,7$ log UFC/cm² em AI e $2,1 \pm 0,5$ log UFC/cm² em PP (Figura 1B), evidenciando a presença de células no estado VBNC. Por outro lado, *E. faecium* teve contagem de CAC de $5,0 \pm 0,6$ log UFC/cm² em AI e $5,3 \pm 0,2$ log UFC/cm² em PP. Assim como observado para o T1, após 14 dias, a população de *L. monocytogenes* foi reduzida abaixo do limite de detecção ($1,4$ log UFC/cm²). A população de CAC de *E. faecium*, após 42 dias apresentou reduções de 0,4 e 0,6 log UFC/cm² em AI e PP, respectivamente. A população de CAV em AI, apresentou pequenas variações em 42 dias, com contagem entre $3,9 \pm 0,3$ e $5,2 \pm 0,1$ log UFC/cm², enquanto que na superfície do PP verificou-se redução de 1,2 log UFC/cm² (Figura 2B). A catalase não demonstrou ser um bom método para recuperação de células no estado

VBNC, uma vez que no geral, as contagens após incubação com catalase ficaram próximas ou abaixo das contagens obtidas sem o emprego da catalase.

CONCLUSÕES:

E. faecium foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em ambos os protocolos de formação de biofilme seco de superfície (DSB) avaliados, independente do material de superfície utilizado. Além disso, *E. faecium* apresentou capacidade de formação de DSB, com viabilidade ao longo de 42 dias tanto em AI quanto em PP.

BIBLIOGRAFIA

- 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).
- 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).
- MINEI, C. C. *et al.* Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Food Protection**, v. 71, n.3, p. 634-638, (2008).
- 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).
- RAMOS, S. *et al.* Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. **Microorganisms**, v. 8. n.8, p. 1118, (2020).
- 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).
- TORRES, C. *et al.* Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. **Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals**, p. 185-227, (2018).
- 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).