

**ELETROMICROGRAFIAS DE CUPONS DE AÇO INOXIDÁVEL, POLIETILENO E VIDRO
ADERIDAS COM BACTÉRIAS *LISTERIA MONOCYTOGENES***

NAYANE APARECIDA ARAUJO DIAS¹, ALEXANDRE CRISTIANO SANTOS JUNIOR²,
DANILA CAIXETA³, APARECIDA SILVIA DOMINGUES⁴, ROBERTA HILSDORF PICCOLI⁵,
EDUARDO ALVES⁶

RESUMO

Biofilme é caracterizado como uma comunidade de células bacterianas irregularmente estruturadas, aderente a uma superfície envolvida em uma matriz de substância polimérica extracelular. Em adição a ocorrência no ambiente como células planctônicas, *L. monocytogenes* tem a habilidade de colonizar uma variedade de superfícies abióticas e bióticas, formando biofilmes. Foi realizada a higienização dos cupons de aço inoxidável, polietileno e vidro. Após este processo foi proporcionada a adesão das células bacterianas aos cupons utilizando a bactéria *Listeria monocytogenes*. Foi realizado o procedimento para fixação dos cupons e posteriormente a visualização no microscópio eletrônico de varredura Evo 040 Leo. Não foi observado em nenhum dos cupons a formação de biofilme, apenas algumas células da bactéria *Listeria monocytogenes* aderidas.

Palavras-chaves: Aço inoxidável, vidro, polietileno, biofilme.

INTRODUÇÃO

O biofilme é caracterizado como uma comunidade de células bacterianas irregularmente estruturadas, aderentes a uma superfície envolvida em uma matriz de substância polimérica extracelular (Harrison et al. 2005).

A formação do biofilme é determinada primeiramente por uma etapa reversível, onde ocorre apenas a aderência da bactéria à superfície, seguida da aderência irreversível, reprodução celular e continuidade da aderência e finalmente a produção do glicocálix (Ciston et al., 2008).

A formação é governada em parte por fatores físico-químicos tais como hidrofobicidade, forças de van der Waals, características ácido-básicas e propriedades elétricas (Gianotti et al., 2008), enquanto que o seu desenvolvimento, depende da linhagem e das condições ambientais (pH, composição do meio de crescimento e temperatura, bem com das propriedades da superfície) (Gueriri et al., 2008).

Cerca de 99% das populações de bactérias estão na forma de biofilme, podendo ser encontradas em superfícies de lentes de contato, cascos de navios, encanamento em indústrias de alimentos e petróleo, pedras em cursos d'água e sílica, aço inoxidável, vidro, alumínio, teflon, materiais de náilon e borracha e em uma variedade de implantes e aparelhos transcutâneos (Dunne Júnior, 2002).

As características macroscópicas e, particularmente, as microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos por microrganismos alteradores (Andrade, 2004).

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva na forma de bastonete, anaeróbica facultativa, largamente distribuída na natureza, podendo ser frequentemente encontrada em grande número de produtos alimentícios e plantas de processamento. Sua ampla distribuição é favorecida pela

¹ Mestranda em Ciência dos Alimentos, DCA/ UFLA, nayaneadias@yahoo.com.br

² Mestrando em Ciência dos Alimentos, DCA/ UFLA, junincs2009@hotmail.com

³ Doutoranda em Microbiologia agrícola, DBI/UFLA, danilacaixeta@hotmail.com

⁴ Mestranda em Microbiologia agrícola, DBI/UFLA, silvia_ufla@yahoo.com.br

⁵ Professor Adjunto, orientador, DCA/UFLA, rhpicoli@dca.ufla.br

⁶ Professor Adjunto, DFP/UFLA, ealves@ufla.br

capacidade de se desenvolver entre 0 e 44 °C, embora sua faixa ótima seja entre 30 e 37 °C, tolera extremos de pH, 4-9, baixa atividade de água e concentrações de NaCl de 10% ou superiores e outras condições ambientais adversas (Filgueiras e Vanetti, 2006).

Em adição à ocorrência no ambiente como células planctônicas, *L. monocytogenes* tem a habilidade de colonizar uma variedade de superfícies abióticas e bióticas, formando biofilmes, que uma vez estabelecidos, apresentam maior resistência a agentes deletérios exógenos (Sandasi et al., 2008).

A microscopia eletrônica de transmissão tem sido considerada poderosa ferramenta para análise da estrutura do biofilme, por outro lado, métodos de microscopia que permitem um exame não invasivo de biofilmes vivos e no seu estado hidratado também são utilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas as análises microbiológicas e de microscopia (Microscopia eletrônica de varredura), respectivamente.

Obtenção do biofilme

Realizou-se a higienização dos cupons de aço inoxidável, polietileno e vidro. Após este processo foi proporcionada a adesão das células bacterianas aos cupons utilizando a bactéria *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.

Análise dos cupons por microscopia eletrônica de varredura

Os cupons de aço inoxidável, polietileno e vidro contendo biofilme com a cultura bacteriana de *Listeria monocytogenes*, foram imersos em solução fixadora (Karnovsky modificado), pH 7,2, pelo período de 48 horas. Após este período, os cupons foram lavados com tampão cacodilato por três vezes por 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em água, por 1 hora. Após este período, foram lavados por três vezes em água destilada e, em seguida, o cupom de aço inoxidável e vidro foram desidratados em gradiente de etanol (25%, 50%, 70% e 90%, por 10 minutos; 100% por três vezes de 10 minutos) e o cupom de polietileno foi desidratado em álcool (25%, 50%, 70% e 90%, por 10 minutos; 100% por três vezes de 10 minutos). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) contendo acetona para completar a secagem do cupom de aço inoxidável e vidro e contendo álcool para secagem do cupom de polietileno, após isto foi montado em stubs e coberto com ouro (metalizador Bal-Tec SCD 050). No final desse procedimento, foram obtidas eletromicrografias dos microrganismos aderidos à superfície do ao inoxidável, polietileno e vidro usando-se microscópio eletrônico de varredura Evo 040 Leo (Alves, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para considerar que células aderidas constituem um biofilme, Andrade et al. (1998) sugerem que seja necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , enquanto Ronner e Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 , respectivamente.

Portanto em nenhuma das superfícies analisadas (aço inoxidável, polietileno e vidro) foi observado a formação de biofilme, apenas algumas células colonizaram os cupons.

Pouco se sabe sobre a fixação e formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*, mas a capacidade de sobrevivência em condições variadas pode estar relacionada com mecanismos moleculares. O fator sigma é um fator de transição que se associa a RNA polimerase, estando envolvido no reconhecimento dos sítios de iniciação de transição (Schaik e Abee, 2005). Estudos revelaram que este fator poderia estar envolvido na regulação da aderência e formação de biofilme por *L. monocytogenes* (Schwab et al., 2005).

Schwab et al. (2005) analisaram três cepas de *L. monocytogenes* quanto à capacidade de formarem biofilme em aço inoxidável na presença do fator sigma. Resultados mostraram que as cepas testadas não formaram biofilme, mas fixaram rapidamente as superfícies.

Enquanto que Blackman e Frank (1996) também analisaram a formação de biofilme por *L. monocytogenes* em materiais utilizados na indústria alimentícia (aço inoxidável, nylon, teflon e polistireno), demonstrando que houve capacidade da *L. monocytogenes* se fixar e formar biofilme.

Ao analisar o cupom de aço inoxidável é possível perceber que este não é completamente uniforme, e isto propicia a adesão de células bacterianas, apesar de não ter ocorrido o desenvolvimento de biofilme, conforme pode ser observado na figura 1.

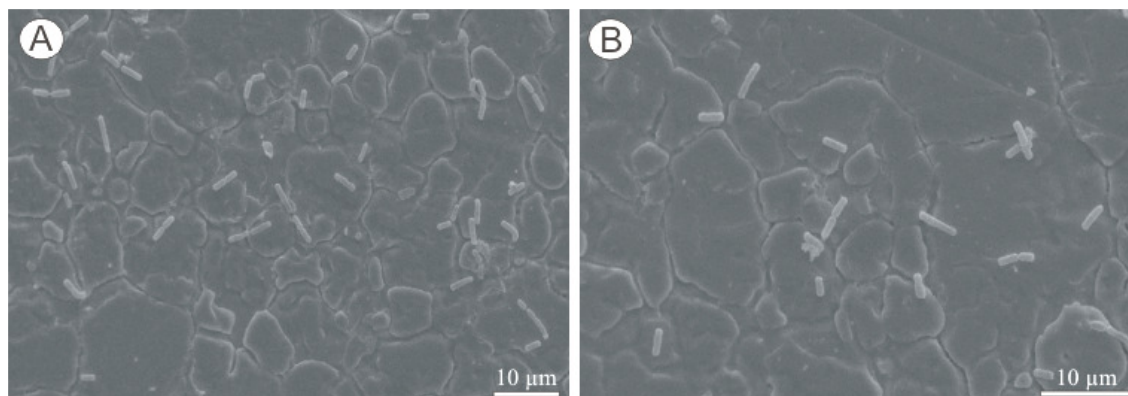


FIGURA 1 – Eletromicrografias de cupons de aço inoxidável com adesão de células bacterianas de *Listeria monocytogenes*. A) Superfície do aço inoxidável. B) *L. monocytogenes* aderidas à superfície.

A microestrutura do cupom de polietileno é completamente desuniforme, apresentando grandes ranhuras em sua estrutura, propiciando a adesão de bactérias, apesar de não ter sido identificado biofilmes da *Listeria monocytogenes* (Figura 2).

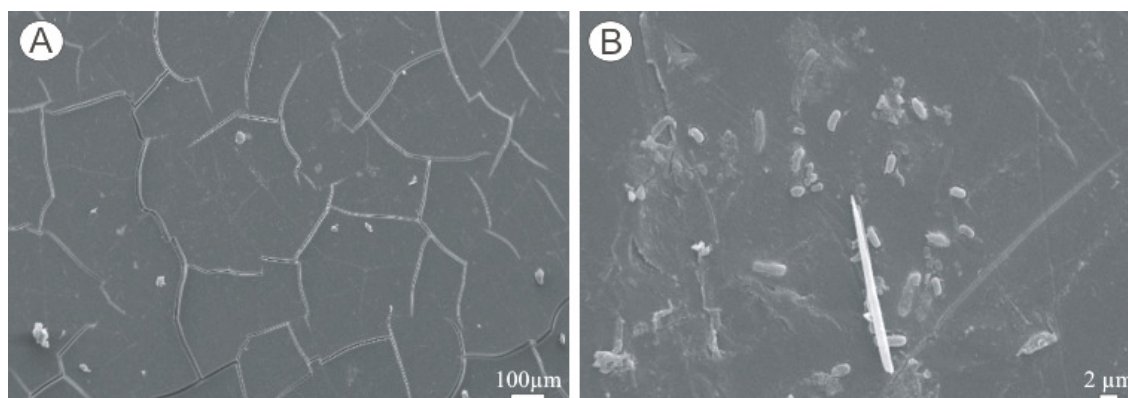


FIGURA 2 – Eletromicrografias de cupons de polietileno com adesão de células bacterianas de *Listeria monocytogenes*. A) Microestrutura do polietileno. B) *L. monocytogenes* aderidas à superfície.

Ao analisar a microestrutura do cupom de vidro foi observado que este apresenta a estrutura mais uniforme dos três cupons analisados, apresentando pequena quantidade de bactérias *Listeria monocytogenes* aderidas (Figura 3).

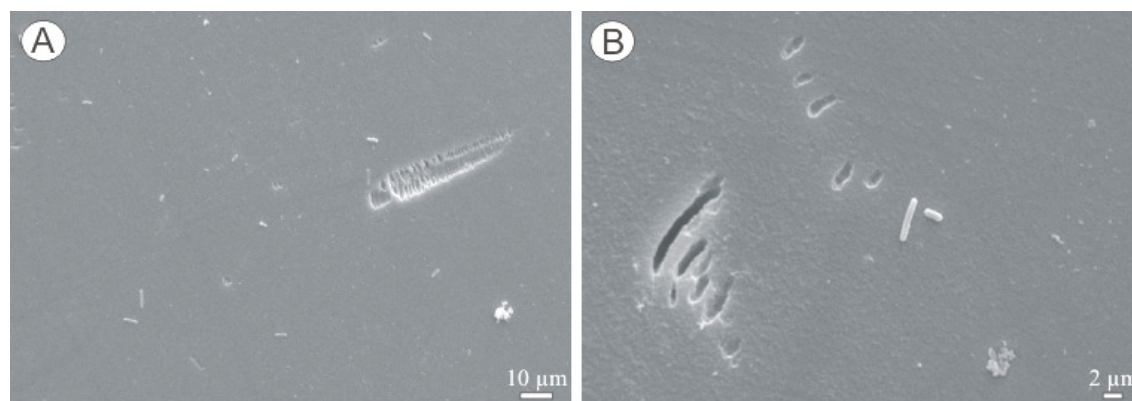


FIGURA 3 – Eletromicrografias de cupons de vidro com adesão de células bacterianas de *Listeria monocytogenes*. A) Microestrutura do vidro. B) Células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície.

CONCLUSÃO

Não foi observado em nenhum dos cupons a formação de biofilme, apenas algumas células da bactéria *Listeria monocytogenes* aderidas.

AGRADECIMENTOS

Aos agentes financiadores: CAPES, FAPEMIG, CNPQ.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALVES, E. **Curso: introdução à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão**. FAEPE: Universidade Federal de Lavras, 2004.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

ANDRADE, N. J. Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios. In: WORKSHOP SOBRE DESENVOLVIMENTO NO SETOR DE LEITE, 2., 2004, Viçosa. **Anais**. Viçosa, MG: UFV, 14 p, 2004.

BLACKMAN, I. C. E FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 827-831, 1996.

CISTON, S.; LUEPTOW, R. M.; GRAY, K. A. Bacterial attachment on reactive ceramic ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**. v. 320, 2008. p. 101–107.

DUNNE JÚNIOR, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology**, Washington, v. 15, n. 2, p. 155-166, Apr. 2002.

FILGUEIRAS, C. T.; VANETTI, M. C. D. Effect of eugenol on growth and Listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n. 3, p. 405-409, may 2006.

GIANOTTI, A.; SERRAZANETTI, D.; KAMDEM, S. S.; GUERZONI, M. E. Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 9-17, 2008.

GUERIRI, I.; CYNAT, C.; DUBRAC, S.; ARANA, A. T.; DUSSURGET, O.; MSADEK, T. The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. **Microbiology**, v. 154, p. 2251-2264, 2008.

HARRISON, J.; TURNER, R.; MARQUES, L.; CERI, H. A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. **American Scientist Classics**. V. 93. n. 6. nov.-dez. 2005.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 1070-1075, 2008.

SCHAIK, W. V. e ABEE, T. The role σ^B in the stress response of gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p. 218-224, 2005.

SCHWAB, U.; TUEWEI, H. U.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Alternative sigma factor δ^B is not essential for *Listeria monocytogenes* surface attachment. **Journal of Food Protection**, v. 68, p.311-317, 2005.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, July 1996.