

O impacto de biofilmes microbianos na higiene e segurança alimentar

Pilar Teixeira, Diana Rodrigues, Maria João Romeu e Joana Azeredo

Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

E-mail: jazeredo@deb.uminho.pt

Introdução

Em 2012 foram reportados na União Europeia 5363 surtos de origem alimentar, resultando em 55453 casos humanos, os quais causaram 5118 hospitalizações e 41 mortes [1]. A maioria dos surtos notificados foi provocada por *Salmonella*, toxinas bacterianas, vírus e *Campylobacter*. Além destes microrganismos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão também entre os patogénicos alimentares mais problemáticos. A formação de biofilmes nas superfícies de processamento de alimentos é uma das principais causas destes surtos. De facto, todos estes microrganismos apresentam uma grande capacidade para formar biofilmes e estes podem desenvolver-se em todo o tipo de superfícies na indústria alimentar, incluindo aço inoxidável, polipropileno, vidro, etc. Os biofilmes constituem uma fonte de contaminação dos alimentos com que contactam e o seu desprendimento das superfícies causa ainda a contaminação do ambiente circundante. Pode definir-se biofilme como um agregado de células microbianas formado sobre uma superfície ou interface frequentemente envolto numa matriz de substâncias poliméricas, a maioria de origem microbiana [2]. Estas estruturas apresentam uma grande tolerância a agressões externas, nomeadamente a agentes antimicrobianos químicos. A tolerância inerente dos biofilmes a biocidas químicos tem suscitado o interesse no desenvolvimento de métodos alternativos de controlo de patogénicos alimentares. Neste artigo serão abordados os princípios fundamentais de adesão e persistência de patogénicos alimentares nas superfícies alimentares e de contacto com alimentos. Será referido o papel dos biofilmes na resistência cruzada e por fim serão apresentados 2 métodos inovadores de controlo de biofilmes.

Adesão a superfícies de contacto com alimentos

A adesão de microrganismos a superfícies de processamento de alimentos é um processo rápido (geralmente ocorre entre 5 a 30 segundos), pelo que, frequentemente, a limpeza e desinfeção dessas superfícies não é suficiente para impedir que essa adesão ocorra. Na fase inicial do processo são determinantes as propriedades superficiais (carga e hidrofobicidade) e a morfologia (rugosidade e porosidade) dos materiais. No entanto, outros fatores como a disponibilidade de nutrientes no meio envolvente, o pH, temperatura e concentração iónica do meio, a fase de crescimento das células bacterianas, a presença de estruturas celulares, como as substâncias poliméricas extracelulares e os flagelos influenciam também o processo de adesão.

Para prevenir e/ou evitar a adesão é assim fundamental a seleção dos materiais adequados bem como o desenvolvimento de produtos e protocolos de desinfeção mais eficientes. A principal estratégia para se obter um material que impede, ou pelo menos minimiza, a adesão bacteriana, consiste na modificação das suas propriedades superficiais. Os materiais podem ser cobertos ou impregnados com agentes antimicrobianos ou alterada a sua hidrofobicidade e /ou rugosidade. A hidrofobicidade de uma superfície traduz a sua afinidade/repulsão em relação à água, e sabe-se que o processo de adesão é facilitado pela hidrofobicidade das superfícies que

interagem. Por seu lado, a rugosidade está relacionada com a topografia do material podendo aumentar/reduzir a área superficial de contato e potenciar/restringir a existência de locais protegidos favoráveis à colonização microbiana.

Assim, é fundamental um conhecimento aprofundado das características dos materiais que promovem a adesão de patogénicos alimentares. Como a hidrofobicidade e a rugosidade dos materiais podem ser alteradas, têm sido efetuados vários estudos que avaliam a capacidade de adesão de vários microrganismos a diferentes tipos de materiais comumente utilizados em superfícies alimentares, tanto de cozinhas como na indústria alimentar [3, 4, 5, 6, 7, 8].

Num estudo em que foi avaliada a capacidade de adesão de 10 estirpes de *Listeria monocytogenes* a 6 materiais normalmente usados em cozinhas (aço inoxidável 304 (SS304), mármore, granito, vidro, polipropileno e silestone (o silestone é um material composto por quartzo com um biocida incorporado - o Microban)), verificou-se que todas as estirpes aderiram a todos os materiais, inclusivamente aos silestone [7]. No entanto, o número de células aderidas foi diferente consoante a estirpe e o material em estudo (Figura 1). Este estudo permitiu concluir que as superfícies com maior propensão para a adesão são o mármore e o granito e que o polipropileno é o material menos sujeito a colonização por parte de *Listeria*.

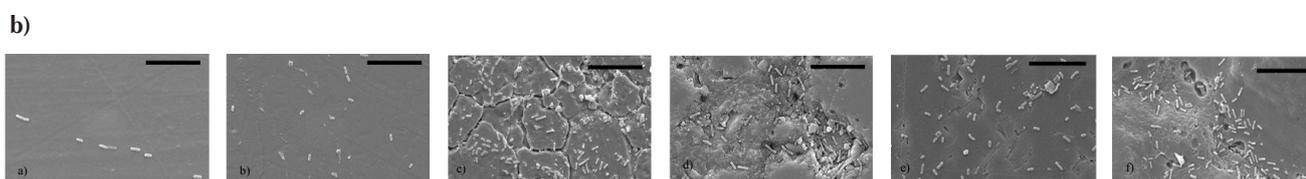
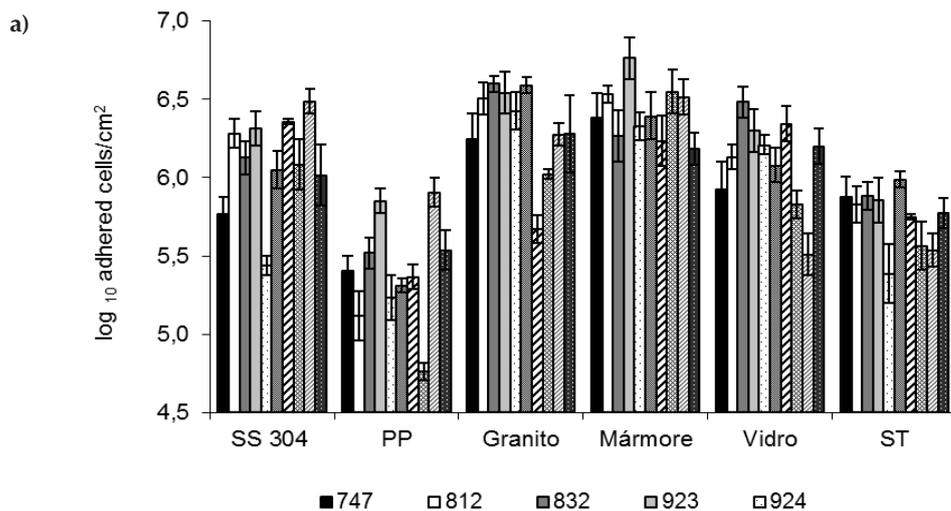


Figura 1 – a) Adesão de vários isolados clínicos e alimentares de *L. monocytogenes* (estirpes 747, 812, 832, 923 e 924) a materiais utilizados no processamento de alimentos: aço inoxidável (SS 304), polipropileno (PP), granito, mármore, vidro e silestone (ST).

b) Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento de células de *L. monocytogenes* aderidas a PP, vidro, SS 304, Silestone, mármore e granito, respectivamente da esquerda para a direita (de a a f)). As barras correspondem a 10 µm.

Persistência em alimentos e superfícies

A maior parte dos produtos comerciais usados na limpeza e desinfecção de superfícies é baseada em compostos fenólicos, ácidos orgânicos, álcoois, cloro, compostos de amônio quaternário e iodóforos. Para todos eles, foi verificada uma maior eficácia contra suspensões bacterianas do que contra células aderidas e biofilmes. Este facto chamou a atenção para a necessidade de reformular os procedimentos padronizados que são usados para testar a eficácia dos desinfetantes, para que os mesmos incluam testes em células aderidas e biofilmes, além das células planctônicas. Entre os vários métodos que têm sido usados para estudar biofilmes microbianos o “Calgary Biofilm Device” (CBD) é um dos mais conceituados, dado que consiste numa técnica *high-throughput* baseada em microplacas e que serve para avaliar a suscetibilidade dos biofilmes a agentes antimicrobianos [9]. Trata-se, portanto, de uma técnica altamente versátil que permite determinar a Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB, ou “MBEC” em inglês) em relação a uma vastíssima gama de produtos e compostos, tais como antibióticos, biocidas, metais e desinfetantes.

Um estudo realizado por nós focado na suscetibilidade de biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. enterica* a diferentes desinfetantes (hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogénio e triclosan) mostrou que, de uma forma geral, os biofilmes de *L. monocytogenes* e *S. enterica* são mais suscetíveis ao hipoclorito de sódio do que a qualquer outro desinfetante testado, indicando este composto como um dos mais eficazes para aplicação prática em ambientes

de processamento alimentar [10]. Por outro lado, este estudo aponta o triclosan como um composto a evitar nos processos de limpeza e higienização, dado que se verificou que todos os biofilmes de *S. enterica* apresentaram elevada tolerância a este agente na gama de concentrações usada. Adicionalmente foi possível observar que, de uma forma geral, a desinfecção foi influenciada por variabilidade intra- e inter-específica, o que realça um problema acrescido no combate aos biofilmes destes patogénicos alimentares (Figura 2).

A importância da resistência cruzada

Outro aspeto importante relacionado com a desinfecção de superfícies é a aquisição de resistência bacteriana a agentes desinfetantes e, mais preocupante ainda, a possível relação entre a utilização de biocidas químicos e a emergência de resistência a antibióticos. A suscetibilidade e resistência de *S. enterica* a diferentes tipos de antimicrobianos têm sido vastamente analisadas, mas o efeito de desinfetantes químicos sobre células de biofilme que sobrevivem à ação destes compostos é ainda pouco estudada. Neste contexto, um dos nossos estudos (ainda não publicado) focou-se na avaliação do efeito da exposição a desinfetantes químicos de uso comum em áreas de processamento alimentar sobre células de biofilme de *S. enteritidis*, em termos de suscetibilidade a antibióticos. Apesar de este estudo não ter revelado a aquisição de uma verdadeira resistência aos antibióticos testados (tendo em conta os valores de referência do “Clinical and Laboratory Standards Institute”), verificou-se que a ação de alguns dos desinfetantes testados promoveu um decréscimo da sus-

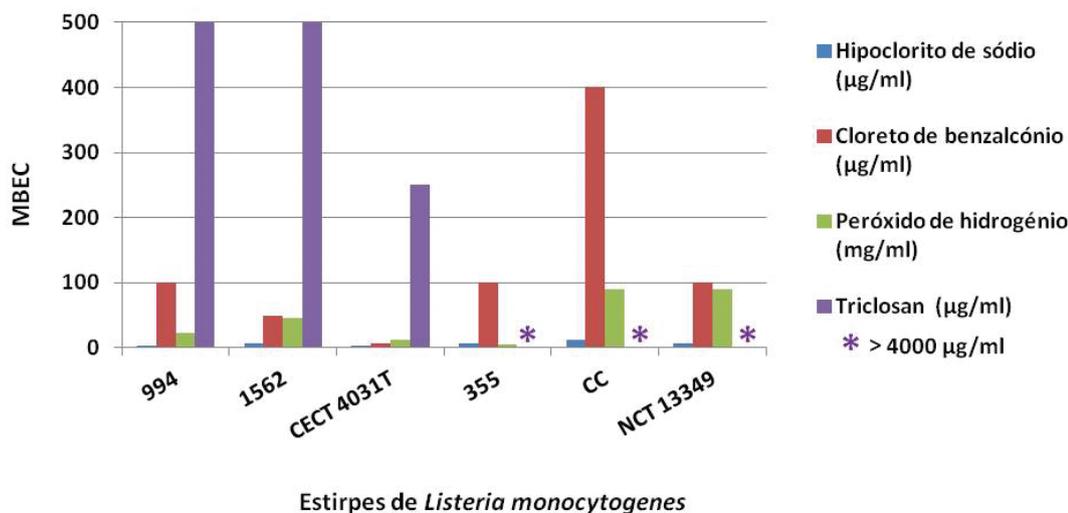


Figura 2 – Concentração Mínima de Erradicação (MBEC) do Biofilme de 4 agentes antimicrobianos testados contra biofilmes de várias estirpes de *Listeria* (994, 1562, CECT4031T, 355, CC e NCT13349)

cetibilidade a certos antibióticos. Em relação ao cloreto de benzalcónio, uma menor suscetibilidade foi observada para a ampicilina e cloranfenicol, enquanto a exposição ao triclosan promoveu uma diminuição da suscetibilidade à ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina e tetraciclina. Finalmente, no que respeita à ação do hipoclorito de sódio, verificou-se que este desinfetante também promoveu um decréscimo na suscetibilidade das células de biofilme de *S. enteritidis* a quatro antibióticos de diferentes classes (ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina e cloranfenicol).

Os resultados acima referidos permitem inferir que uma possível infecção causada por células de biofilme de *Salmonella* sobreviventes a desinfecção química poderá estar associada a uma suscetibilidade diminuída em termos de terapia com antibióticos. Evidencia-se, assim, a importância de avaliar as características fenotípicas das células de biofilmes de agentes patogénicos após exposição a agentes químicos dado que, além de permitir obter mais informação sobre os mecanismos envolvidos na resistência a biocidas, esta abordagem poderá conduzir ao desenvolvimento de tratamentos adicionais que não promovam a ocorrência de resistência cruzada.

Novos métodos de Controlo

A procura de novos métodos de desinfecção continua a ser um assunto relevante nos nossos dias. Embora os métodos tradicionais de desinfecção sejam intensivamente usados pela indústria alimentar, tal como se pode constatar pela informação apresentada nos tópicos anteriores eles são também quimicamente intensivos e estão associados a vários aspetos negativos, incluindo a promoção do fenómeno de resistência cruzada a outros agentes antimicrobianos. Recentemente, a nanotecnologia veio trazer novas possibilidades para melhorar as estratégias antimicrobianas. Dentro deste vasto campo de investigação, revela-se de grande interesse a síntese e aplicação de nanopartículas superparamagnéticas, isto é, nanopartículas magnéticas com capacidade de produzir calor (hipertermia magnética - HM) quando submetidas a um cam-

po magnético oscilante. Neste contexto, um estudo por nós realizado avaliou o efeito da HM em células planctónicas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* (um dos principais microrganismos causadores de deterioração de alimentos), tendo também sido comparada a sua eficiência em relação a uma técnica de aquecimento convencional (em “thermoblock”). Os resultados obtidos confirmaram que a HM consegue inativar a bactéria em questão, sendo mais eficaz contra células planctónicas e biofilmes do que a técnica de aquecimento convencional usada [11]. Conclui-se, portanto, que as nanopartículas magnéticas podem ser eficazmente usadas como fonte de aquecimento, permitindo o aquecimento eficiente e rápido de soluções contendo nanopartículas e células bacterianas. De realçar que, embora a HM tenha revelado um maior efeito bactericida contra as células planctónicas do que contra os biofilmes, a sobrevivência e a estrutura destas comunidades microbianas foram também afetadas por este tratamento [11]. Em suma, ainda que preliminar, este estudo introduziu a possibilidade de usar a HM fora da área biomédica como um potencial método de desinfecção em áreas de processamento alimentar.

Os bacteriófagos (fagos) constituem outra opção promissora para o controlo de agentes patogénicos uma vez que são predadores naturais de bactérias, ubíquos no meio ambiente, são fáceis de isolar, apresentam uma elevada especificidade, ausência de toxicidade, baixo custo de produção, são inofensivos aos seres humanos e têm uma grande capacidade de evolução para superar a resistência bacteriana. Esta última característica deve-se à capacidade que os fagos apresentam de lisar os hospedeiros (bactérias) utilizando mecanismos de controlo bacteriano diferente dos antibióticos, sendo assim capazes de matar bactérias resistentes a antibióticos.

Estas características fazem com que os fagos constituam uma boa alternativa de controlo de biofilmes. De facto, os fagos e as suas endolisinas já foram usados para controlar o desenvolvimento de biofilme de *L. monocytogenes* e *E. coli* [12, 13] e o efeito sinérgico de um fago com um desinfetante alcalino foi descrito para a erradicação de biofilme de

E. coli O157:H7 em aço inoxidável [13]. Podem ser eficazes tanto em biofilmes simples como em biofilmes mistos [14].

Conclusão

Devido à capacidade que os microrganismos patogênicos de origem alimentar têm de aderir às superfícies de processamento de alimentos e de nelas formar biofilmes, que vão contaminar os alimentos com que contactam, a sua prevenção e eliminação são uma preocupação constante da indústria alimentar. A melhor estratégia consiste numa higienização e desinfecção eficiente dessas superfícies. No entanto, devido a falhas de projeto dos equipamentos e à cada vez maior resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias de controlo. Apesar de alguns estudos já versarem sobre a aplicação destes agentes em biofilmes de patogênicos alimentares, ainda é necessário um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na formação desses biofilmes, para que, deste modo, seja possível a sua eliminação.

Referências

- [1] EFSA (2014) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012, EFSA Journal, 12(2), 3547
- [2] Bryers, J. D., editor (2000). Biofilms. 2. New York, NY: J. Wiley Interscience
- [3] Oliveira K., Oliveira T., Teixeira P., Azeredo J., Henriques M., Oliveira R. (2006) Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella enteritidis* serotypes to materials used in kitchens. J Food Prot 69 (10):2352–2356
- [4] Oliveira K., Oliveira T., Teixeira P., Azeredo J., Henriques M., Oliveira R. (2007) Factors involved in attachment of *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* to stainless steel. Brazilian J Microbiol 38 (2), 318-323
- [5] Teixeira P., Lima J. C., Azeredo J., Oliveira R. (2007) Note. Colonisation of bench cover materials by *Salmonella typhimurium*. Food Sci Technol Int 13 (1):5–10
- [6] Teixeira P., Lima J., Azeredo J., Oliveira R. (2008) Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. Int J Food Sci Technol 43 (7):1239–1244
- [7] Silva S., Teixeira P., Oliveira R., J. Azeredo (2008) Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. J. Food Protect 71 (7), 1379-1385
- [8] Rodrigues D., Teixeira P., Oliveira R., Azeredo J. (2011) *Salmonella enterica enteritidis* biofilm formation and viability on regular and triclosan incorporated bench cover materials. J Food Protect 74 (6):32–37
- [9] Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 37, 1771-1776
- [10] Rodrigues, D., Cerca, N., Teixeira, P., Oliveira, R., Ceri, H., Azeredo, J. (2011) *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica Enteritidis* biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. Microb Drug Resist 17 (2), 181-189
- [11] Rodrigues, D., Bañobre-López, M., Espiña, B., Rivas, J., Azeredo J. (2013) Effect of magnetic hyperthermia on biofilm structure and cellular viability of a food spoilage bacterium. Biofouling 29, 1225-1232
- [12] Gaeng S., Scherer S., Neve H., Loessner M. J. (2009) Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophageytic enzymes in *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 66:2951–2958
- [13] Sharma M., Ryu J., Beuchat L.R. (2005) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. J Appl Microbiol 99:449–459
- [14] Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J. (2010) Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. Biofouling 26 (5):567–575



spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Visite o nosso site
www.spbt.pt