

Biofilmes de bactérias lácticas em dornas de madeira como potencial sistema de bioconservação de alimentos

Biofilms of lactic bacteria on wooden drawings as a potential food bioconservation system

Biopelículas de bacterias lácticas sobre dibujos de madera como potencial sistema de bioconservación de alimentos

Recebido: 16/09/2024 | Revisado: 17/10/2024 | Aceitado: 20/10/2024 | Publicado: 23/10/2024

Luiz Carlos Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6873-3567>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, Brasil

E-mail: luiz.ferreira@ifnmg.edu.br

Brenda Santos Farias

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-2737-2081>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, Brasil

E-mail: brendafaarias475@gmail.com

Resumo

A conservação de alimentos com baixo custo e segurança tem sido um grande desafio para a indústria de alimentos e os consumidores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de biofilmes de bactérias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) em dornas de madeiras e seu potencial para bioconservação de alimentos. Foram utilizadas dornas de madeira para os ensaios de formação de biofilmes de bactérias lácticas inoculadas, com acompanhamento do aumento da acidez da solução conservante e coleta de amostras dos biofilmes formados nas paredes da dorna de madeira para avaliar a contagem de bactérias lácticas. Foram realizados estudos visando avaliar o potencial de inibição de patógenos, utilizando-se os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. As dornas de madeiras possibilitaram o crescimento de bactérias lácticas e demonstram ser um sistema eficiente para formação de biofilmes, além disso, o crescimento de bactérias lácticas neste sistema inibiu satisfatoriamente o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas.

Palavras-chave: Conservação de alimentos; Biocontrole; Garantia de segurança.

Abstract

Low-cost and safe food preservation has been a major challenge for the food industry and consumers. The objective of this work was to evaluate the formation of biofilms of lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) in wooden vats and their potential for food biopreservation. Wooden vats were used to test biofilm formation of inoculated lactic acid bacteria, monitoring the increase in acidity of the preservative solution and collecting samples of biofilms formed on the walls of the wooden vats to evaluate the lactic acid bacteria count. Studies were carried out to evaluate the potential for inhibiting pathogens, using the microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. The wooden vats allowed the growth of lactic acid bacteria and proved to be an efficient system for the formation of biofilms. Furthermore, the growth of lactic acid bacteria in this system satisfactorily inhibited the growth of potentially pathogenic bacteria.

Key words: Food preservation; Biocontrol; Security guarantee.

Resumen

La conservación de alimentos segura y de bajo costo ha sido un gran desafío para la industria alimentaria y los consumidores. El objetivo de este trabajo fue evaluar la formación de biopelículas de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) en tinas de madera y su potencial para la bioconservación de alimentos. Se utilizaron tinas de madera para probar la formación de biopelículas de bacterias de ácido láctico inoculadas, monitoreando el aumento de la acidez de la solución conservante y recogiendo muestras de biopelículas formadas en las paredes de las tinas de madera para evaluar el recuento de bacterias de ácido láctico. Se realizaron estudios para evaluar el potencial de inhibición de patógenos, utilizando los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*. Las tinas de madera permitieron el crecimiento de bacterias del ácido láctico y demostraron ser un sistema eficiente para la formación de biopelículas. Además, el crecimiento de bacterias del ácido láctico en este sistema inhibió satisfactoriamente el crecimiento de bacterias potencialmente patogénicas.

Palabras clave: Conservación de los alimentos; Biocontrol; Garantía de seguridad.

1. Introdução

Ao longo dos últimos anos, foi possível verificar um aumento do número de consumidores que preferem alimentos minimamente processados, preparados sem conservantes químicos (Cleveland *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2002). Muitos destes alimentos, prontos para o consumo, representam novos sistemas alimentares em relação aos riscos a saúde e a associação com deterioração. Vários conservantes naturais têm destacado e ganhado considerável atenção da comunidade científica, consumidores, indústria e setores da saúde como um método antimicrobiano de ampla ação e geralmente econômico (Baptista *et al.*, 2020).

Visando compreender e conhecer a complexidade das interações microbianas, métodos recentes têm sido cada vez mais direcionados para as possibilidades oferecidas pela bioconservação (Holzapfel *et al.*, 1995; Gould, 1996; Ross *et al.*, 2002), aumentando o interesse por agentes antimicrobianos produzidos naturalmente (Cleveland *et al.*, 2001; Lemay *et al.*, 2002).

A bioconservação de alimentos é uma abordagem ecológica e inofensiva que utiliza a microbiota natural ou controlada para estender o prazo de validade de alimentos, aumentando a segurança (Rocha, 2020). A pesquisa sobre a composição e funcionalidade de consórcios microbianos complexos está ganhando impulso e abrirá novos caminhos para controlar e melhorar os processos de conservação de alimentos e desenvolver novas aplicações para culturas mistas (Smid e Lacroix, 2013).

As bactérias lácticas podem produzir compostos antimicrobianos como as bacteriocinas que são amplamente utilizadas na agricultura como agente conservante de alimentos para controlar vários patógenos de origem alimentar (Ahmad *et al.*, 2017). Sendo assim, esse estudo visa avaliar a possibilidade de formação de biofilmes de bactérias lácticas em dornas de madeiras e seu potencial para bioconservação de alimentos.

2. Metodologia

Realizou-se uma pesquisa experimental, laboratorial e de natureza quantitativa, consistindo em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo e definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (Pereira *et al.*, 2018, Baptista & Campos, 2016, Koche, 2011, Gil, 2017).

Foram utilizadas cinco dornas de madeira umburana com capacidade de cinco litros cada uma para os ensaios de formação de biofilmes. Salmoura com 2% de NaCl foi preparada como meio de inoculação de bactérias lácticas. A água para o preparo da salmoura foi oriunda de fonte de abastecimento pública. Inóculo de bactérias lácticas foi adicionado às dornas de madeira com a salmoura para promover a formação de biofilmes. Em cada dorna de madeira foi adicionado um inóculo de bactérias lácticas correspondente a 10^5 a 10^6 UFC mL⁻¹ de salmoura. Durante seis meses, a cada mês as dornas de madeiras foram esvaziadas para avaliação da formação de biofilmes.

Para avaliar a formação de biofilmes de bactérias lácticas como método permanente de conservação, após o esvaziamento das dornas não foram feitas novas inoculações de bactérias lácticas, também não foram aplicados nenhum procedimento de limpeza ou sanitização das dornas, apenas foi trocada a solução conservante.

Foram utilizadas duas estratégias para avaliar a formação de biofilmes: 1) acompanhamento do aumento da acidez da solução de salmoura conservante através da análise de pH; 2) coleta de amostras dos biofilmes formados nas paredes da dorna de madeira para avaliar a contagem de bactérias lácticas. A amostragem de biofilmes formados nas dornas de madeira foi realizada na superfície interna das dornas, onde as células foram removidas de 4 (quatro) áreas diferentes de 100 cm², utilizando *swabs* estéreis.

Após os primeiros seis meses, foi comprovando a formação de biofilmes de bactérias lácticas nas dornas de madeira e foram realizados estudos visando avaliar o potencial de inibição de patógenos promovido pelas mudanças físico-químicas e microbiológicas no ecossistema das dornas de madeiras. Os microrganismos patogênicos utilizados no teste de inibição foram cepas de *Escherichia coli* (CCCD E003), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella enterica* (CCCD S004).

Das cinco dornas de madeira utilizadas no experimento, duas dornas foram inoculadas com *Escherichia coli* com inóculo de 10^5 UFC mL⁻¹, duas dornas foram inoculadas com *Salmonella enterica* com inóculo de 10^5 UFC mL⁻¹ e uma dorna foi inoculada com um inóculo de 10^5 UFC mL⁻¹ de *Staphylococcus aureus*. Após 30 (trinta) e 60 (sessenta) dias da inoculação dos patógenos, amostras da solução conservante foram analisadas para quantificar a presença de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e analisar a presença/ausência de *Salmonella enterica*. As análises de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* foram realizadas de acordo com metodologia descrita pela *American Public Health Association* (Apha, 2015).

3. Resultados e Discussão

A contagem de *Lactobacillus acidophilus* nas dornas de madeira é apresentada na Tabela 1. A contagem total variou de 3,38 a 5,96 log₁₀ UFC mL⁻¹. A contagem de *L. acidophilus* foi determinada em um período de noventa dias, confirmando a presença de elevada contagem viável em todas as dornas de madeira. Como as dornas foram esvaziadas após trinta dias, a contagem de *L. acidophilus* só pode ser atribuída a liberação espontânea dos biofilmes na dorna.

Tabela 1 - Contagem de *Lactobacillus acidophilus* na solução conservante e em biofilmes de dornas de madeira após 30, 60 e 90 dias de inoculação e pH da solução conservante.

Dorna	Dias após inoculação	pH	Contagem de <i>L. acidophilus</i> na solução conservante (log ₁₀ UFC mL ⁻¹)	Contagem de <i>L. acidophilus</i> nos biofilmes (log ₁₀ UFC/cm ²)
1	30	6,2	5,52	5,64
	60	5,2	4,36	6,62
	90	4,2	4,22	6,44
2	30	6,3	5,74	6,84
	60	4,4	4,86	5,60
	90	3,2	4,64	6,48
3	30	6,4	5,14	6,46
	60	4,3	4,48	6,62
	90	3,3	4,08	6,30
4	30	6,2	4,52	4,26
	60	4,6	3,68	4,78
	90	3,4	3,38	4,96
5	30	6,8	5,96	5,22
	60	4,7	4,84	6,56
	90	3,2	4,12	6,58

Resultados expressos como UFC mL⁻¹ (3 x 100 cm² de superfície coletada em 50 mL de água peptona 0,1%). Fonte: Dados da pesquisa.

A elevada contagem de *L. acidophilus* na solução da dorna foi consistente com a alta contagem nos biofilmes (Tabela 1). A contagem de bactérias lácticas no biofilme formado na madeira das dornas atingiu valores de até 10⁶ UFC por cm² (Tabela 1). A acidificação da solução conservante das dornas se deu provavelmente a liberação de células de *L. acidophilus* do biofilme, reduzindo o pH final para cerca de 3 (Tabela 1).

São poucos os relatos na literatura sobre a capacidade de bactérias lácticas de formarem biofilmes na superfície diretamente em contato com a madeira (Mariani *et al.*, 2007). Licitra *et al.* (2007) avaliaram a presença de um biofilme

contendo bactérias do ácido lático em cuba de madeira utilizada na fabricação de queijo, determinando a segurança, composição, microestrutura e papel deste biofilme. Esses autores encontraram altas contagens totais bacterianas encontradas nas superfícies da madeira, confirmando a ocorrência de um rico biofilme.

Após um mês da inoculação nas dornas de madeira contendo biofilmes de lactobacilos, não foi detectada a presença de *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, entretanto, *Staphylococcus aureus* foi encontrado nas dornas de madeira após um mês de inoculação (Tabela 2). Estudando a variabilidade dos biofilmes de bactérias lácticas em dornas de madeira utilizada na fabricação de queijos, Lortal *et al.* (2009) observaram ausência de *Salmonella*, *Listeria* e *E. coli* O157:H7, reforçando a hipótese da segurança deste sistema de cubas de madeira para explicar a incapacidade dos patógenos de aderir ou sobreviver, possivelmente devido a fatores como as condições na superfície da madeira (pH abaixo de 5), competição por nutrientes, além da provável produção de bacteriocinas por bactérias lácticas nos biofilmes formados.

Tabela 2 - Contagem de *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e detecção da presença/ausência de *Salmonella enterica* na solução conservante em dornas de madeira após desafio de inibição.

		Contagem (\log_{10} UFC mL ⁻¹)	
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Desafio 1	Inóculo inicial	6	Presença
	Após 30 dias	5,22	Ausência
	Após 60 dias	4,2	Ausência
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Desafio 2	Inóculo inicial	6	4
	Após 30 dias	5,24	2,01
	Após 60 dias	4,2	N.D.
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Desafio 3	Inóculo inicial	6	4
	Após 30 dias	5,2	N.D.
	Após 60 dias	4,3	N.D.

Fonte: Dados da pesquisa.

Didienne *et al.* (2012), estudando as características de biofilmes de bactérias lácticas em dornas de madeira na venda de queijos, demonstraram a contaminação desse produto por patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, confirmando a capacidade inibitória dos biofilmes de bactérias lácticas sobre esses patógenos. A dorna de madeira é um sistema seguro e altamente eficiente de formação de biofilmes de bactérias lácticas, principalmente promovendo a acidificação (Licitra *et al.*, 2007).

Elumalai & Shanmugasundaram (2024) discutem o uso de bactérias do ácido lático como agentes emergente de biocontrole visando à segurança alimentar, com ênfase na capacidade dessas bactérias de produzir ácidos orgânicos, bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos que podem inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, concluindo que o uso desses microrganismos na segurança alimentar demonstrou grande potencial na redução do risco de doenças transmitidas por alimentos e na melhoria da qualidade dos alimentos. Azevedo *et al.* (2024), avaliando a utilização de bactérias do ácido lático no controle de patógenos alimentares, concluíram que essas bactérias parecem ser fortes candidatas para aplicação potencial como proteção a ser usada na indústria alimentícia, sendo não somente seguras, mas também capazes de

produzir bacteriocinas estáveis, inibindo efetivamente patógenos alimentares significativos como *L. monocytogenes* e *C. perfringens*.

4. Conclusão

As dornas de madeiras possibilitaram o crescimento de bactérias lácticas e demonstram ser um sistema altamente eficiente para formação de biofilmes desse grupo de bactérias, além disso, o crescimento de bactérias lácticas neste sistema inibiu satisfatoriamente o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas.

Entretanto, estudos posteriores poderão demonstrar com maiores detalhes os efetivos mecanismos de ação dessas bactérias no controle de potenciais patógenos de origem alimentar.

Referências

- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A. & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 49(1), 1-11.
- APHA (2015). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association.
- Azevedo, I., Barbosa, J., Albano, H., Nogueira, T. & Teixeira, P. (2024). Lactic Acid Bacteria isolated from traditional and innovative alheiras as potential biocontrol agents. *Food Microbiology*. 119, 104450.
- Baptista, M. N. & Campos, D. C. (2016). *Metodologias de Pesquisa em Ciências - Análise Quantitativa e Qualitativa*. Barueri/SP: Ed. LTC.
- Baptista, R. C., Horita, C. N. & Sant'ana, A. S. (2020). Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: a review. *Food Research International*. v.127. Doi: 10.1016/j.foodres.2019.108762. 2020.
- Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F. & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal Food Microbiology*. 71, 1-20, 2001.
- Didienne, R.; Defargues, C.; Callon, C.; Meylheuc, T.; Hulin, S. & Montel, M. C. (2012). Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 156, 91-101.
- Elumalai, A. & Shanmugasundaram, S. (2024). *Emerging Trends in Biological Control Agents for Food Safety Applications*. London/UK: CRC Press.
- Gil, A. C. (2017). *Como elaborar projetos de pesquisa*. 6 ed. São Paulo/SP: Ed. Atlas.
- Gould, G. W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 51-64.
- Holzappel, W. H.; Geisen, R. & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 24, 343-362.
- Köche, J. C. (2011). *Fundamentos de metodologia científica*. Petrópolis/RJ: Ed.Vozes.
- Lemay, M. J.; Choquette, J.; Delaquis, P. J.; Gariépy, C.; Rodrigue, N.; Saucier, L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 217-226, 2002.
- Licitra, G.; Ogier, J. C.; Parayre, S.; Pediliggieri, C.; Carnemolla, T. M.; Falentin, H.; Madec, M. N.; Carpino, S. & Lortal, S. (2007). Variability of the bacterial biofilms of the "tina" wood vat used in the Ragusano cheese making process. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 6980-6987.
- Lortal, S.; Blasi, A.; Madec, M.; Pediliggieri, C.; Tuminello, L., Tanguy, G.; Fauquant, J.; Lecuona, Y.; Campo, P.; Carpino, S. & Licitra, G. (2009). Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *International Journal of Food Microbiology*. 132, 1-8.
- Mariani, C.; Briandet, R.; Chamba, J. F.; Notz, E.; Carnet-Pantiez, A.; Eyoug, R. N. & Oulahal, N. (2007). Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science*. 90, 1653-1661.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J. & Shitsuka R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. 1 ed. Santa Maria/RS: Ed. UAB/NTE/UFSM.
- Rocha, I. P. M. (2020). *Avaliação do efeito conservador de substância tipo bacteriocina produzido por *Pediococcus acidilactici* em suco de laranja*. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Unoeste. Presidente Prudente. 2020.
- Ross, R. P.; Morgan, S. & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 79, 3-16.
- Smid, E. J. & Lacroix, C. (2013). Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(2), 148-154.