

Diversidade do gênero *Listeria* em uma planta de abate e industrialização de aves

Miguel Ângelo Pinho¹
Roberto Degenhardt²
Artur Smânia Júnior^{1*}

¹Laboratório de Antibióticos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina
CEP 88040900, Florianópolis, SC

²Laboratório de Biotecnologia Alimentar, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina

* Autor para correspondência
smania@mbox1.ufsc.br

Submetido em 24/11/2005
Aceito para publicação em 03/05/2006

Resumo

Os estudos de diversidade microbiana têm o objetivo de indicar a composição de uma comunidade de microrganismos em um determinado local, permitindo quantificar espécies e estimar a grandeza das populações. As indústrias de alimentos monitoram a contaminação através de análises de superfície, evitando que os patógenos tenham contato direto com os alimentos. Combinando estudos de diversidade microbiana com programas de controle de contaminações, é possível identificar as espécies presentes em pontos estratégicos rastreando as rotas de contaminação. No presente trabalho, direcionou-se o estudo da diversidade para um gênero de reconhecida importância na indústria de alimentos. O gênero *Listeria* possui seis espécies descritas, sendo uma, *L. monocytogenes*, patogênica aos seres humanos. O estudo apontou o fluxo ininterrupto de duas espécies do gênero (*L. innocua* e *L. welshimeri*), desde as possíveis fontes de contaminações até os pontos de contato direto com o produto final. Isso não ocorreu com *L. monocytogenes*, que só foi identificada nas fontes. Quanto à diversidade deste gênero, foi identificada uma comunidade composta por *L. innocua* (66,07%), *L. monocytogenes* (17,86%), *L. welshimeri* (15,18%) e *L. grayi murray* (0,89%).

Unitermos: diversidade microbiana, *Listeria*, segurança alimentar

Abstract

Diversity of the genus *Listeria* in slaughterhouse and factories of the poultry industry. One of the aims of microbial diversity studies is to indicate the structure of a community in a specific place, allowing species identification and population quantification. Food factories need to be monitored for contamination by surface analyses, indicating a possible flux of pathogens in order that they may be interrupted before the contamination of the final product occurs. Combining studies of microbial diversity with contamination control programs, it is possible to identify species and to track possible routes of contamination. The study was restricted to an important bacterium affecting a single sample factory. The genus *Listeria* comprises six species, and *L. monocytogenes* is a human pathogenic bacterium. The study pointed to the uninterrupted flux of two species of the genus (*L. innocua* and *L. welshimeri*) from possible sources of contamination to points of contact with the

final product. However, the bacterium *L. monocytogenes* was only found at the sources. Concerning genus diversity, a community of 66.07% of *L. innocua*, 17.86% of *L. monocytogenes*, 15.18% of *L. welshimeri* and 0.89% *L. grayi murray* was identified.

Key words: microbial diversity, genus *Listeria*, food safety

Introdução

A segurança alimentar tem crescido em importância juntamente com os novos processos de industrialização e com as novas tendências do comportamento do consumidor. Ela é entendida como a garantia em adquirir um alimento que possua como característica intrínseca a sanidade, bem como tenha atributos nutricionais e sensoriais desejáveis (Benevides e Lovatti, 2004). As enfermidades de origem alimentar têm sido reconhecidas como um problema de saúde pública de grande abrangência no mundo, causando diminuição da produtividade, perdas econômicas e afetando a confiança do consumidor nas organizações envolvidas (Nascimento, 2000). Em anos recentes, organismos do gênero *Listeria* têm sido reconhecidos como responsáveis por surtos de intoxicações alimentares veiculadas por alimentos (Trabulsi et al., 1999; Tompkin, 2002; Martino et al., 2005).

Esse gênero é reconhecido como patógeno para os animais a mais de 70 anos, mas apenas nas últimas décadas foi dada ênfase ao papel dos alimentos na transmissão da listeriose humana (Bell e Kyriakides, 1998). O gênero *Listeria* é constituído de organismos Gram-positivos, com morfologia cocóide a cocobacilar. São catalase-positivas, oxidase-negativas e fermentam a glicose, produzindo ácido, mas não gás. Não formam esporos (Trabulsi et al., 1999).

A frequência e a diversidade de ambientes nos quais as espécies de *Listeria* são encontradas levam a considerar este microrganismo como ubiqüitário, sendo capaz de se desenvolver em ampla faixa de temperatura (0 a 44°C), elevada tolerância ao sal (até 10,5%) e capacidade de crescer em substratos de baixo pH e atividade de água (Pereira e Rocourt, 1993).

Todas as espécies de *Listeria* são encontradas na natureza e podem eventualmente contaminar os alimentos. Porém, somente *L. monocytogenes* é patogênica para os seres humanos (Carter, 1995), tornando-se um

dos principais patógenos nas doenças transmitidas pelos alimentos (Taeye, 1999).

A associação entre produtos cárneos e casos de listeriose, bem como o fato de *L. monocytogenes* ser isolada com frequência nestes produtos no varejo, indica que os produtos refrigerados, congelados e pratos prontos inadequadamente reaquecidos constituem risco para a saúde pública. Esse risco é potencialmente maior em produtos que não sofrem o devido aquecimento antes da ingestão (Farber e Peterkin, 1991).

O tratamento térmico do presunto cozido, por exemplo, elimina *Listeria*, mas os processos subsequentes, como o fatiamento e empacotamento, podem causar a recontaminação se os procedimentos de higiene forem insuficientes ou falhos (Stegemann, 1988). Em decorrência disso, esses procedimentos devem ser avaliados quanto a sua capacidade de evitar que contaminações ambientais cheguem até o produto final. Uma das medidas de monitoração é realizada com base em análises microbiológicas de superfície (Figueiredo, 1999).

A variedade de espécies detectada nessas análises fornece informações sobre as condições sanitárias do local onde foram coletadas. Os estudos de diversidade microbiana possibilitam identificar o papel ecológico chave que determinados microrganismos desempenham no funcionamento desses ecossistemas, destacando-se, entre outras, as atividades microbianas de decomposição (Zak et al., 1994) bem como a contaminação de diversos habitats (Bradley, 1991).

Em face destas informações, este trabalho teve por objetivo determinar a composição da comunidade do gênero *Listeria* nos setores e equipamentos de uma indústria de alimentos para revelar o fluxo da *L. monocytogenes*, bem como determinar as possíveis fontes desse patógeno, verificando, também, a eficiência das barreiras sanitárias empregadas para impedir a contaminação dos produtos finais.

Material e Métodos

Coleta dos espécimens para análise microbiológica

Foram coletadas 349 amostras de superfícies em quatro áreas da planta industrial: Área de abate e

evisceração de aves, área de resfriamento de carcaças, área de corte e desossa de carcaças e área de embalagem inicial de produtos cozidos (sala asséptica). Nas três primeiras áreas foram coletadas 174 amostras; na última área foram coletadas 175 amostras (Tabela 1).

TABELA 1: Relação dos pontos de coleta em fábrica, e classificação quanto ao nível de contaminação e resíduos industriais.

Área	Ponto de Coleta	*Zona
Abate e Evisceração	Ralo evisceração	1
	Ralo evisceração – abaixo do quadro do dosador de cloro	1
	Calha PCC1	2
	Calha do extrator de traquéia	2
Resfriamento de carcaças	Piso da saída do banheiro	1
	Piso entre as esteiras	1
	Mesa de classificação de fígado	2
	Guia de inox do chiller 2	3
	Guia de inox do chiller 3	3
	Box da saída do chiller de fígado	3
Corte e desossa	Ralo scanvaegt – kakugiri	1
	Ralo tumbler – salmourado	1
	Ralo entre a mesa de asa e coxa	1
	Ralo abaixo da scanvaegt asa	1
	Mesa de asa lado direito – SLC II	3
	Mesa de asa lado esquerdo – SLC II	3
	Mesa de coxa 1 lado direito – SLC II	3
	Mesa de coxa 1 lado esquerdo – SLC II	3
	Mesa de peito lado direito – SLC II	3
	Mesa de peito lado esquerdo – SLC II	3
Sala asséptica	Pisos	1
	Botas dos manipuladores	1
	Rodos	1
	Gelo dos girofreezers	2
	Maçanetas de portas	2
	Paredes da saída dos fornos	2
	Paredes da entrada dos girofreezers	2
	Paredes da saída dos girofreezers	2
	Luvas dos manipuladores	3
	Superfícies de aço inoxidável	3
	Esteiras transportadoras	3
	Funis das balanças embaladoras	3

* Zona 1: pontos onde não há contato com os alimentos, com rica comunidade de microrganismos, resíduos industriais, água de escoamento e trânsito de pessoas; Zona 2: pontos de contato indireto com os alimentos produzidos, moderadamente rica em espécies microbianas e resíduos industriais; Zona 3: pontos em contato com os produtos, com quantidade de microrganismos e resíduos industriais muito reduzidas ou pontos da área de embalagem primária do produto final com alto grau de assepsia.

Isolamento e identificação dos microrganismos

Os espécimes coletados foram processados no mesmo dia da coleta. Foram pré-enriquecidas e homogeneizadas em 10mL de caldo *Listeria Enrichment Broth Base* (UVM), incubadas a 30°C±1 por 48 horas em ausência de luz. Em seguida, foi transferido 0,1mL das culturas pré-enriquecidas para 10mL de caldo *Fraser* para enriquecimento seletivo e diferencial. Das amostras que apresentaram reação de esculinase positiva, transferiu-se uma alçada para *Ágar Listeria Ottavani & Agosti* (ALOA) e as culturas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Das culturas onde se observou o crescimento de colônias típicas do gênero *Listeria*, essas foram transferidas para caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para posterior identificação das espécies, através de testes bioquímicos (catalase, motilidade a 22°C, hemólise em ágar CASOY, prova do fator CAMP, fermentação de carboidratos), segundo a International Standart Organization (1996).

Estudo da diversidade microbiana

A diversidade do gênero *Listeria* foi estimada pelo número de espécies identificadas (Riqueza Específica), e o número de ocorrências de uma espécie sobre o total de isolados do gênero (abundância relativa). Essa última grandeza permite observar o tamanho da população de cada espécie detectada em comparação com as outras encontradas na mesma zona (conjunto de pontos de mesma classificação).

O índice de diversidade utilizado foi o Coeficiente de Mistura de Jentsch (QM). Este relaciona o número de espécies identificadas ao número total de isolados (Farias et al., 1994).

$$QM = S/N$$

Onde:

S = número de espécies detectadas

N = número total de isolados

Dessa forma, quanto mais próximo de 1 for o valor obtido, maior a diversidade do local estudado.

Resultados

Do total de 349 espécimes coletados, 70 resultaram culturas positivas para o gênero *Listeria* (20,06%). A riqueza específica do gênero foi de quatro espécies. Dos 70 espécimes positivos foram obtidos 112 isolados de *Listeria*. O valor obtido pelo índice de diversidade foi de QM=0,036. A abundância relativa dentro do gênero *Listeria* referente aos 112 isolados está representada na figura 1.

Cabe ressaltar que, neste trabalho, foi detectada uma elevada diversidade de espécies em termos de riqueza específica, tendo sido isoladas 4, das 6 espécies descritas para o gênero *Listeria*. Na figura 1 ficou evidenciada a dominância da população de *L. innocua*. Esta espécie não é patogênica aos seres humanos, ao contrário de *L. monocytogenes*, que foi a segunda maior população do gênero na fábrica, e que representa risco a saúde pública.

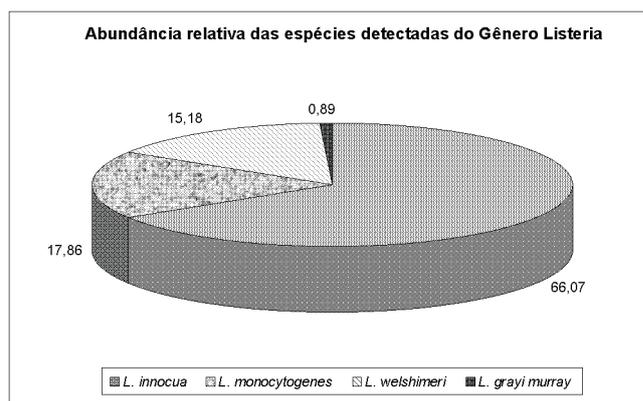


FIGURA 1: Abundância relativa das espécies do gênero *Listeria* em 112 isolados obtidos em ambiente de fábrica. Valores calculados a partir do total do número de cepas identificadas de cada espécie em toda a fábrica, dividido pelo número total de cepas identificadas do gênero *Listeria*.

A distribuição das espécies de *Listeria* nas: Zona 1, Zona 2 e Zona 3 está representada nas figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

Observando a figura 2, pode ser notado, que nos pontos estudados onde não ocorreu contato com o alimento, a diversidade do gênero foi elevada. Isso é devido à presença de resíduos industriais e a alta umidade nesses locais, o que viabiliza a ocorrência de uma diversa comunidade. Esses pontos são de difícil higienização,

e com transito freqüente de trabalhadores que se deslocam entre diferentes áreas da fábrica.

Nos pontos de contato indireto com os alimentos (zona 2 representada na figura 3) verificou-se a ausência de *L. monocytogenes*, cuja presença se restringe aos pontos da zona 1.

Nos pontos da zona 3 (figura 4), houve uma redução da população de *Listeria*, sendo que a dominância foi de *L. innocua*.

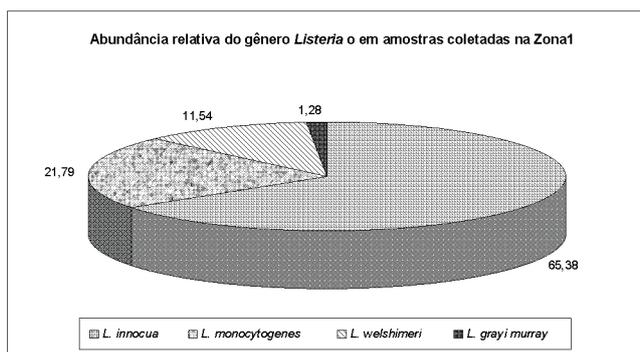


FIGURA 2: Abundância relativa do gênero *Listeria* em isolados obtidos da Zona 1. Representação gráfica da abundância relativa detectada nos pontos de classificação 1, agrupados na denominada Zona 1. *Listeria innocua* representa 65,38% da comunidade microbiana. *Listeria monocytogenes* 21,79%, *L. welshimeri* 11,54% e *L. grayi murray* 1,28%.

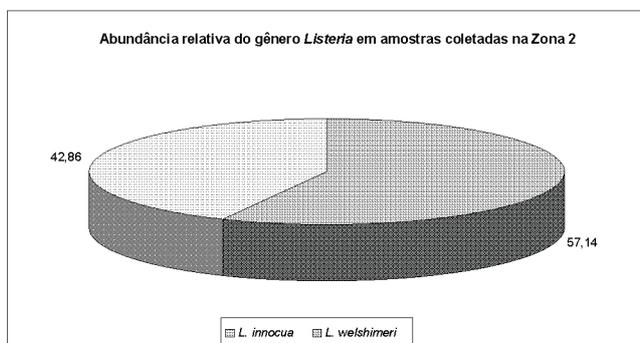


FIGURA 3: Abundância relativa do gênero *Listeria* em isolados obtidos da Zona 2. Representação gráfica da abundância relativa detectada nos pontos de classificação 2. 57,14% da comunidade microbiana é composta por *L. innocua* e 42,86% por *L. welshimeri*.

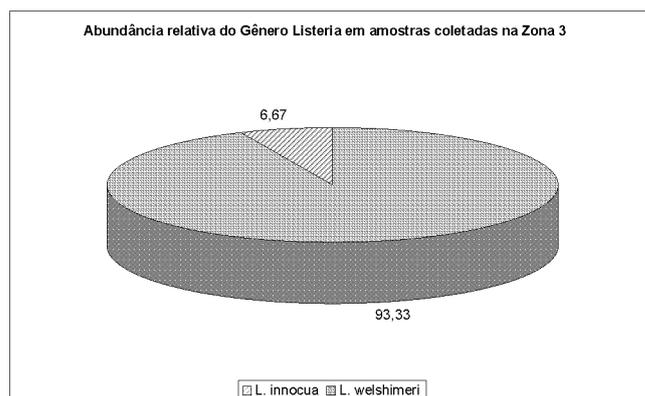


FIGURA 4: Abundância relativa do gênero *Listeria* em isolados obtidos da Zona 3. Representação gráfica da abundância relativa correspondente aos pontos de classificação 3, agrupados na denominada Zona 3. *Listeria innocua* 93,33% e *L. welshimeri* 6,67%.

Discussão

Estudos de diversidade do gênero *Listeria*, em alimentos processados, é de grande importância devido à possibilidade desse gênero causar doenças em humanos (Tompkin, 2002). No presente trabalho, o baixo valor obtido com o índice de diversidade aplicado deve-se principalmente ao fato de o estudo limitar-se a apenas um gênero de bactéria, o qual contém 6 espécies. Porém, se for analisada a diversidade do gênero, esta pode ser considerada elevada, uma vez que foram detectadas 4 espécies distintas. Os dados obtidos da Zona 1 (Figura 2) revelam que as 4 espécies estão presentes nesses pontos, inclusive *L. monocytogenes* como a segunda maior população da comunidade, sendo esses pontos relacionados às possíveis fontes deste patógeno. São pontos de alta umidade, contendo resíduos de natureza variada ou pontos de difícil higienização, situações que favorecem o crescimento microbiano.

Seguindo para os pontos da Zona 2, percebe-se que os tratamentos sanitários e de higienização adotados pela fábrica não impediram o fluxo de bactérias do gênero *Listeria* para esses locais. Foram detectadas 2 espécies nesses pontos (*L. innocua* e *L. welshimeri*), mas estas não são patogênicas aos seres humanos. A *L. monocytogenes* não esteve presente nos espécimens obtidos destes pontos, mostrando que não houve fluxo desta espécie da Zona 1 para a Zona 2. As mesmas duas espécies detectadas na Zona 2 constituem tam-

bém a comunidade do gênero *Listeria* da Zona 3, os pontos que entram em contato direto com o produto final havendo grande risco de contaminação do mesmo.

Dessa forma, infere-se que essas duas espécies apresentam resistência aos tratamentos usados e alto grau de adaptação ao ambiente da fábrica. Os pontos da Zona 3 sofrem intensas higienizações, mas a temperatura ambiente pode ser considerada uma pressão positiva sobre as populações de *Listeria*. As espécies desse gênero podem ser classificadas como psicrófilas e mesófilas (Gray e Killinger, 1996) e um ambiente com a temperatura igual ou inferior a 10°C juntamente com os demais tratamentos reduziria drasticamente a diversidade geral de microrganismos, em um estágio próximo ao que se denomina de vácuo microbiológico.

Os dados obtidos com o cálculo da abundância relativa mostraram que *L. innocua* é a espécie mais frequente do gênero em todas as Zonas. Possíveis relações de antagonismo poderiam estar ocorrendo dentro do gênero, uma vez que à medida que a frequência dessa espécie cresce, a riqueza específica do gênero se reduz. Na Zona 3 (Figura 4), *L. innocua* representa 93,33% da comunidade do gênero, convivendo com apenas a espécie *L. welshimeri*.

Mesmo que *L. monocytogenes* não esteja sendo transportada da Zona 1, este patógeno está presente no ambiente de fábrica e é a segunda população mais abundante do gênero. Esse fato requer tanto medidas rígidas de higiene na produção quanto à orientação dos funcionários que trabalham nas proximidades desses pontos sobre os perigos que os processos realizados nessas áreas representam para a saúde pública.

Referências

- Bell, C.; Kyriakides, A. 1998. *Listeria – una a práctica al microorganismo y su control en los alimentos*. 1. ed. Acribia, Zaragoza, España, 173pp.
- Benevides, C. M. J.; Lovatti, R. C. C. 2004. Segurança alimentar em estabelecimentos processadores de alimentos. **Higiene Alimentar**, **18**: 24-27.
- Bradley, P. M. 1991. Aerobic biodegradation potencial of surface microrganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, **121**: 57-63.
- Carter, G. R. 1995. *Listeria: essentials of veterinary microbiology*. 5. ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 430pp.
- Farber J. M.; Peterkin P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. **Microbiological Reviews**, **55**: 476-511.
- Farias, J. A. C.; Pés, I. F. T. L.; Alvarez Filho, A. 1994. **Estrutura fitossociológica de uma floresta estacional decidual na região de Santa Maria, RS**. Disponível em <http://www.ufsm.br/cienciaflorestal/artigos/v4n1/art7v4n1.pdf. Acesso em 02 de fevereiro de 2004.
- Figueiredo, R. M. 1999. **Manual de procedimentos e desenvolvimento de SSOP e PRP**. 1. ed. Núcleo de Assistência a Cultura e Arte, São Paulo, Brasil, 164pp.
- Gray, M. L.; Killinger, A. H. 1996 *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**, **30**: 309-382.
- International Standard Organization. 1996. **ISO 11290-1:1996 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method**.
- Martino, K. G.; Marks, B. P.; Campos, D. T.; Tamplin, M. L. 2005. Quantifying the robustness of a broth-based model for prediction *Listeria monocytogenes* growth in meat and poultry products. **Journal of Food Protection**, **68**: 2310-2316.
- Nascimento, F. C. A. 2000. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas por alimentos. **Nutrição em Pauta**, **8**: 22-26.
- Pereira, M. L.; Rocourt, J. 1993. *Listeria monocytogenes* – uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, **26**: 5-12.
- Stegemann, H. 1988. The effect of heat pasteurization on *Listeria monocytogenes* in canned cured ham. **Tenth International Symposium on Listeriosis**, Pecs, Hungary, p.22-26.
- Taege, A. J. 1999. Listeriosis: recognizing it, treating it, preventing it. **Cleveland Clinical Medicine**, **66**: 375-80.
- Tompkin, R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, **65**: 709-725.
- Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F.; Candeias, J. A. N. 1999. **Microbiologia**. 3. ed. Atheneu, São Paulo, Brasil, 586pp.
- Zak, J. C.; Willg, M. R.; Moorhead, D. L.; Wildman, H. G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, **26**: 1101.