

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

FORMAÇÃO DE BIOFILME EM PLACAS DE POLIESTIRENO E HIDROFOBICIDADE DE *Salmonella* HEIDELBERG ISOLADAS DE ABATEDOURO AVÍCOLA

Natalie N. Rizzo, Vinícius Z. Tagliari, Amauri P. Oliveira, Daiane Ferreira, Augusto B. Valério, Francielle M. Bohrer, Vanessa Delavechia, Graciela Trenhago, Jucenara Soares, Sílvio C. Rodegheri, Ricardo M. Taglieti, Raquel Girardello, Elci L. Dickel, Luis C. Kreutz, Vladimir P. Nascimento, Luciana R. dos Santos, Laura B. Rodrigues

Laboratório de Microbiologia. CEPA/UPF

**Email: laurab@upf.br*

RESUMO

Bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas a principal causa de infecções alimentares em humanos associadas a produtos avícolas. Estas bactérias são capazes de formar biofilmes em diferentes superfícies, dificultando sua eliminação por procedimentos rotineiros de limpeza e sanificação na indústria de alimentos. Estudos demonstram uma melhor adesão microbiana com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão. Neste trabalho avaliou-se a formação de biofilme em placas de poliestireno por *S. Heidelberg* isoladas de abatedouros avícolas, cultivadas em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose e a hidrofobicidade destas cepas na fase logarítmica (4h) e na fase estacionária (24h). No caldo TSB sem suplementação com glicose, todas as amostras foram capazes de formar biofilme, sendo a maioria fracamente formadora (FRF). Nos caldos TSB + 0,5, TSB + 1,0 e TSB + 1,5% de glicose, todas as amostras foram FRF. Nos caldos TSB com 2,0 a 4,0% de glicose, várias amostras apresentaram-se não formadoras (NF) e as demais FRF. Após a incubação a 36 °C, 4 horas, o índice de hidrofobicidade foi inferior a 10%, sendo as amostras (16/16) altamente hidrofílicas. Na incubação a 36 °C, 24h os resultados foram distintos, sendo 1/16 altamente hidrofóbica, 9/16 com média hidrofobicidade e 6/16 altamente hidrofílicas. As *S. Heidelberg* foram capazes de formar biofilmes na superfície testada, enfatizando a necessidade da verificação da formação de biofilmes em outras superfícies, além de avaliar-se outros hidrocarbonetos e tempos de incubação, devido às amostras altamente hidrofóbicas e com média hidrofobicidade.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os contaminantes da carne de aves, a *Salmonella* spp. é o mais relevante enteropatógeno humano em surtos associados ao consumo deste alimento (Delazari, 1998). As salmonelas, entre outros microrganismos, são capazes de formar biofilme em diferentes superfícies. Na indústria alimentícia, muitas vezes encontram ambientes propícios para seu desenvolvimento, aumentando o risco da contaminação devido a sua permanência após a

higienização. Do ponto de vista da segurança alimentar e da degradação de alimentos, os biofilmes bacterianos são importantes devido a sua formação em alimentos, utensílios, superfícies e a sua dificuldade de remoção.

Os biofilmes em condições naturais tendem a ser compostos por microrganismos em culturas mistas, e são considerados mais resistentes aos produtos utilizados comumente para limpeza e sanificação (JAY, 2005; FORSYTHE, 2002). A formação e presença de biofilme têm sido estudadas através do uso de diferentes metodologias de quantificação, sendo muito utilizado o ensaio em placas de microtitulação (CHRISTENSEN et al., 1982).

As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Estudos mostram que a adesão microbiana se torna melhor com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a formação de biofilme em placas de poliestireno por *Salmonella* Heidelberg (SH) isoladas de abatedouro avícola e cultivadas em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose e avaliar a hidrofobicidade dessas cepas em diferentes tempos de incubação: no início da fase logarítmica (4 horas) e na fase estacionária (24 horas).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

Utilizaram-se no experimento 15 amostras de *S. Heidelberg* (SH) isoladas em abatedouro avícola e a *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Para avaliação da formação de biofilme em placas de poliestireno inocularam-se as amostras em ágar TSA sem glicose e TSA suplementado com 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0% de glicose, incubados a 36 °C por 24 horas. Transferiu-se as amostras para caldo TSB com as mesmas concentrações de glicose (36 °C, 24h). Inocularam-se 200 µL de suspensão bacteriana, em triplicata, em placas de poliestireno e caldo TSB não inoculado, nas diferentes concentrações, eram controles negativos. Os poços foram aspirados, lavados três vezes com 250 µL de NaCl a 0,9% e fixados com 200 µL de metanol p.a. por 15 min.. Removeram-se, secaram-se as placas e coraram-se com 200 µL de cristal violeta de Hucker 2% por 5 min., lavaram-se e secaram-se. A leitura foi obtida em leitor de ELISA a 550 nm e classificaram-se as amostras em: não formadora de biofilme ($DOa \leq DOcn$), fracamente formadora de biofilme ($DOcn < DOa \leq 2 \cdot DOcn$), moderadamente formadora de biofilme ($2 \cdot DOcn < DOa \leq 4 \cdot DOcn$) e fortemente formadora de biofilme ($4 \cdot DOcn < DOa$) (STEPANOVIC et al., 2000).

Para avaliar a hidrofobicidade de *S. Heidelberg*, em diferentes tempos de incubação, inocularam-se as amostras em caldo BHI (36 °C, 4h – 36 °C, 24h). Em ambos os tempos, padronizaram-se 4 mL de uma suspensão bacteriana com tampão PBS (0,01M, pH 7,2) em DO igual a 1.0 através da leitura da absorbância por espectrofotometria a 400 nm. Posteriormente, 3,6 mL de cada suspensão bacteriana foram adicionados a 0,4 mL de xileno. A mistura foi agitada em vortex (5min) e deixada em repouso (20min). Atingido o equilíbrio das fases oleosa/aquosa, a camada inferior foi removida e lida a absorbância a 400 nm. O branco era o caldo BHI com tampão PBS ou caldo BHI com tampão PBS e xileno. O índice de hidrofobicidade (IH) foi determinado aplicando-se a fórmula: $IH = 100 \times (V_i - V_f) / V_i$, sendo V_i absorbância inicial e V_f absorbância final. Considerou-se para $IH > 70\%$ a bactéria altamente hidrofóbica, para $IH < 30\%$ altamente hidrofílica e para $30\% < IH < 70\%$ média hidrofobicidade (GIRARDELLO, 2007)

2.2 Resultados e discussão

Na incubação em caldo TSB sem suplementação (TSB + 0% de glicose), todas as amostras foram capazes de formar biofilme, sendo a maioria fracamente formadora (FRF). Duas amostras no TSB + 0% foram fortemente formadoras de biofilme (FF), a EB7 e a EB10, ambas de carcaças. Nos caldos TSB + 0,5, TSB + 1,0 e TSB + 1,5% de glicose, todas as amostras foram FRF. A partir da incubação nos caldos TSB suplementados com 2,0 a 4,0% de glicose, várias amostras apresentaram-se não formadoras (NF) e as demais FRF. A amostra EB10 foi considerada FRF em todos os caldos suplementados com glicose.

Um biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebida em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos, e exibe um fenótipo alterado quanto ao seu crescimento, expressão gênica e produção de proteínas (DONLAN; COSTERTON, 2002). Nesse microambiente são formados microcolônias e canais de água utilizados para o transporte de nutrientes (JAY, 2005).

Joseph et al (2001) avaliaram a ação de sanitizantes sobre biofilmes e células planctônicas, havendo diferença entre os resultados obtidos, com o biofilme apresentando maior resistência. Evidenciou-se a necessidade de procedimentos de limpeza feitos de forma criteriosa em ambientes produtores de alimentos, já que somente o uso de sanitizantes em biofilmes íntegros não apresentou bons efeitos. Das SH testadas, todas eram provenientes de abatedouro avícola e formaram biofilme em meio sem adição de glicose, o que demonstra a capacidade de desenvolvimento de biofilme em ambientes com poucos nutrientes, como Dewanti; Wong (1995) demonstraram anteriormente com a *E. coli* O157:H7. Isto se torna mais preocupante em relação à EB10, proveniente de carcaça após o *chiller*, local com grande dificuldade de higienização durante a produção da carne de frango, tornando a presença de biofilme de SH um risco para a saúde pública.

Com relação à hidrofobicidade, observou-se que, após a incubação a 36°C por quatro horas, o índice de hidrofobicidade foi inferior a 10%, considerando todas as amostras (16/16) altamente hidrofílicas. Entretanto, as amostras EB2 e EB9 apresentaram densidade óptica (D.O.) final maior que a inicial, resultando em valores negativos. Isto pode ter ocorrido em razão de alguma falha no procedimento, provavelmente no momento da pipetagem após a separação com o xileno. Na incubação a 36 °C por 24 horas as amostras apresentaram resultados distintos, sendo 1/16 altamente hidrofóbica, 9/16 com média hidrofobicidade e 6/16 altamente hidrofílicas.

A adesão bacteriana pode ser dividida em dois estágios, primária e secundária. O primeiro estágio é reversível e é determinado por variáveis físico-químicas, como as interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas, que vão determinar a adesão entre as duas superfícies, a célula bacteriana e a superfície de interesse. Na adesão secundária ocorre uma mediação molecular entre adesinas específicas e superfície. O microrganismo consolida sua adesão através da produção de um complexo exopolissacarídeo e/ou ligando receptores específicos presentes nas pilis com a superfície do material. No final deste estágio a adesão é irreversível (COSTERTON et al., 1995).

Componentes da superfície celular promovem (hidrofobinas) ou reduzem (hidrofílinas) as propriedades que podem coexistir na superfície bacteriana, podendo ocorrer alterações na estrutura da matriz de exopolissacarídeos durante a curva de crescimento (ROSEMBERG et al., 1986). Pôde-se observar que, nas amostras avaliadas, houve grande alteração do índice de hidrofobicidade em relação ao tempo de incubação. Entretanto, outros fatores podem alterar estes resultados, como o hidrocarboneto utilizado. Neste sentido, Rosemberg et al. (1980) testaram diferentes microrganismos frente ao xileno, octano e

hexadecano, obtendo variações nos resultados quanto ao volume de hidrocarboneto e bactéria avaliada.

3 CONCLUSÃO

As *Salmonellas* Heidelberg testadas eram provenientes de abatedouro avícola e tiveram capacidade de formar biofilmes na superfície testada, enfatizando a necessidade da continuação do trabalho para verificação das condições necessárias para a formação de biofilme em superfícies como aço inox e poliuretano, sempre em contato com alimentos em abatedouros avícolas. Além disto, devem-se avaliar outros hidrocarbonetos e melhores tempos de incubação, principalmente ao fato da presença de amostras altamente hidrofóbica e com média hidrofobicidade.

4 REFERÊNCIAS

- CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L. Adherence of slime-producing *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection Immunology**, v. 37, p. 318-326, 1982.
- COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESSEY, G. G. Bacterial biofilmes in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- DELAZARI, I. Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves. In: SEMANA ACADÊMICA VETERINÁRIA, 8. São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1998. p.71-77.
- DEWANTI, R.; WONG, A. C. L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 147-164, 1995.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 410p.
- GIRARDELLO, R. **Estudo da formação de biofilme por Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com infecção urinária**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina - PR, 2007.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.
- ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p. 29-33, 1980.
- ROSENBERG, M.; KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. **Advances Microbiology Ecology**, v. 9, p. 353-393, 1986.
- STEPANOVIC', S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiology Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.