

Área: Ciência de alimentos

***Salmonella* spp. ISOLADAS DE ABATEDOUROS AVÍCOLAS COM CAPACIDADE DE FORMAR BIOFILMES**

Jéssica Zolim Andreatto Mandelli^{1*}, Sara Gehlen², Nathanyelle Aquino³, Daniela Bohr¹, Edinara Lima⁴, Laura Beatriz Rodrigues¹, Luciana Ruschel dos Santos¹

¹PPGBioexp, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

²CDPA Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Mestranda PPGCV/UFRGS, Porto Alegre, RS.

³PPGCTA, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

⁴ Curso de Medicina Veterinária – FAMV, Universidade de Passo Fundo, RS.

*E-mail: jessica_andreatto@yahoo.com.br

RESUMO – A *Salmonella* sp. é microrganismo patogênico zoonótico, frequentemente interligado a surtos de doenças de origem alimentar associados à ingestão de alimentos de origem avícola. Possui ótima capacidade de adaptação a condições ambientais adversas e elevada capacidade de formação de biofilmes. Os biofilmes são células com forte adesão e difícil eliminação por agentes sanitizantes, responsáveis pela contaminação de alimentos, superfícies e utensílios. Este trabalho teve como objetivo verificar a capacidade de formação de biofilmes de 12 sorovares distintos de *Salmonella* spp., isolados de abatedouros avícolas. Os 12 sorovares testados apresentaram aderência à placa de poliestireno em pelo menos uma das temperaturas, prevalecendo os fracamente aderentes. Na temperatura de 25°C foi possível observar que 50% dos isolados apresentou-se moderadamente aderente a placa de poliestireno. Os resultados obtidos neste estudo denotam grande relevância, visto que os sorovares de *Salmonella* podem permanecer nas superfícies de manipulação de alimentos de abatedouros avícolas na forma de biofilmes e conseqüentemente serem transferidos para os alimentos.

Palavras-chave: Biofilmes, *Salmonella*, alimentos de origem avícola.

1 INTRODUÇÃO

A formação de biofilmes foi identificada muito antes de 1970 (COSTERTON et al., 1987). Inicialmente, acreditava-se que os microrganismos eram apenas células suspensas livres que desenvolviam crescimento em meios de cultura nutritivos, ou seja, células planctônicas. Em meio a diversos estudos, sabe-se que a maior parte da atividade bacteriana na natureza não ocorre com as células individualizadas crescendo na forma livre, e sim com as bactérias organizadas em biofilmes (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

Biofilmes consistem em grupos celulares bacterianos aderidos a superfícies bióticas, como células e tecidos, ou abióticas, como vidro, poliestireno, fibra de aço, envolvidos por uma matriz de exopolissacarídeo

(EPS), caracterizadas por estruturas tridimensionais complexas com grande resistência aos ambientes de estresse. Acredita-se que os microrganismos representem menos de 10% da massa de um biofilme, e os 90% restantes sejam de materiais extracelulares (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A função multicelular e a heterogeneidade da matriz dos biofilmes contam também com componentes como água, polissacarídeos e outras macromoléculas, bem como micro canais internos, úteis na distribuição de água e nutrientes, no escoamento de metabólitos e enzimas indispensáveis para o funcionamento das células e distribuição de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (BOYEN et al., 2009).

Acredita-se que os biofilmes são formados em cinco etapas, que compreendem: 1) as células planctônicas começam a se aproximar de superfícies sólidas. Durante esta etapa, a célula bacteriana pode se mover e a forças que influencia essa reversibilidade é atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas; 2) mudança da fase reversível para irreversível. Produção de polímeros ou adesinas específicas na superfície das bactérias, tornando imobilizados estes organismos ao substrato, iniciando sua multiplicação na superfície e formação de monocamada; 3) início do desenvolvimento de formação do biofilme; 4) formação de micro colônias no biofilme maduro. As substâncias extracelulares possibilitam o acesso aos nutrientes. Nesta etapa, formam-se canais de água que permitem a entrada dos nutrientes e saída de metabólitos do biofilme. Os microrganismos desenvolvem diferenciação metabólica e fisiológica com relação às células planctônicas; 5) nesta fase, ocorre a dispersão das bactérias do biofilme e o ciclo é reiniciado (DONLAN; COSTERTON, 2002; STOODLEY et al., 2002).

Sabe-se que, algumas propriedades físico-químicas das superfícies contribuem para a melhor adesão do microrganismo, em especial a hidrofobicidade. Superfícies mais hidrofóbicas, ásperas e em locais que ocorre o processamento de alimentos são mais aderentes ao microrganismo e o substrato (DONLAN; COSTERTON, 2002). As salmoneloses são um problema de saúde pública e experimentos avaliando a possível capacidade de formação de biofilmes são importantes para a identificação da patogenicidade de sorovares não comumente associados à gastroenterites em humanos, mas regularmente isolados em materiais de origem avícola.

A *Salmonella* spp. é uma bactéria cosmopolita, adaptada a condições ambientais adversas como solo e adubo, e sobrevivem no meio ambiente por longos períodos, podendo colonizar aves, répteis, gado, roedores, animais domésticos e o homem. Nos meses de verão e outono, a incidência de infecções por *Salmonella* é muito grande, principalmente em crianças com menos de 5 anos e adultos com mais de 60 anos, quando consomem alimentos contaminados sem o devido cozimento ou refrigeração. As fontes mais comuns de infecções em humanos são produtos de origem avícola e laticínios, bem como, superfícies que entraram em contato com produtos contaminados e são reutilizados sem a desinfecção adequada (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

As salmonelas podem multiplicar-se em uma variação de temperatura de 5°C a 45°C, com uma temperatura ótima de crescimento em torno de 38 °C, enquanto o pH varia de 4.5 a 9.0, com pH ótimo de 6.5 - 7.5. Pelo fato de não serem produtores de esporos, podem ser destruídas a 60°C por aproximadamente 15 minutos (SGARBIERI, 2006).

A verificação sobre a possível formação de biofilmes é de extrema importância para a saúde pública e segurança alimentar da população, pois são células com forte adesão e difícil eliminação por agentes

sanitizantes, responsáveis pela contaminação de alimentos, superfícies e utensílios. Este trabalho teve como objetivo verificar a habilidade de 12 sorovares distintos de *Salmonella* spp., isolados de abatedouros avícolas, formar biofilmes em microplacas de poliestireno, sob diferentes temperaturas de incubação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 12 amostras de *Salmonella* spp. dos sorovares Brandenburg, Anatum, Tenesse, Agona, Bredeney, Schwarzengrund, Infantis, Rissen, Lexington, Typhimurium e Gallinarum, previamente isoladas de abatedouros avícolas, antes e após a higienização, conforme Tabela 1. O sorovar padrão utilizado foi a *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Tabela 1: Identificação dos sorovares de *Salmonella* spp. e locais de origem das amostras

Sorovares de <i>Salmonella</i> spp.	Origem
<i>S. Brandenburg</i>	Carcaça após higienização
<i>S. Anatum</i>	Swab de cloaca
<i>S. Tenesse</i>	Carcaça congelada por 24 horas
<i>S. Agona</i>	Esponja de gaiola de transporte após higienização
<i>S. Bredeney</i>	Swab de cloaca
<i>S. Schwarzengrund</i>	Swab de cloaca
<i>S. Infantis</i>	Esponja de gaiola de transporte após higienização
<i>S. Rissen</i>	Swab de cloaca
<i>S. Lexington</i>	Esponja de gaiola de transporte após higienização
<i>S. Panamá</i>	Swab de cloaca
<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>S. Gallinarum</i>	Carcaça congelada por 60 dias

As amostras encontravam-se armazenadas em *Brain-Heart Infusion* (BHI) congeladas a -18°C . Foi realizada reativação de cada isolado em caldo não seletivo BHI incubado a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, posteriormente semeadas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD) e incubadas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Depois de 24 h foi observado o padrão de colônias para avaliar a compatibilidade com *Salmonella* spp., confirmadas com testes bioquímicos.

Os testes para avaliação da formação de biofilmes foram realizados em microplacas de poliestireno inerte de fundo chato, contendo 96 cavidades serão realizados adaptando as metodologias descritas por RODRIGUES et al., 2009 e STEPANOVIC et al., 2007.

Foram repicados aproximadamente uma alçada dos microrganismos previamente isolados em 2 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth without dextrose) com 0,5% de cloreto de sódio e incubado durante 24 horas a

36° C. Após este período, foi realizada uma suspensão bacteriana diluída em caldo TSB não inoculado correspondente a escala 1 de MacFarland. Em seguida, 200 µL da suspensão bacteriana de cada amostra foram inoculadas em microplacas de poliestireno inerte de fundo chato, contendo 96 cavidades, realizado em triplicata. O controle utilizado foi caldo TSB estéril, também em triplicata. Foi inoculada uma placa para cada temperatura de incubação, 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, por 24 horas.

Transcorrido o período de incubação, foi realizada a aspiração de toda suspensão bacteriana contida na microplaca e cada cavidade foi lavada por 3 vezes com 250 µL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9 % para total remoção de células planctônicas. Então, adicionado 200 µL de metanol P.A. por 15 minutos para ocorrer à fixação das células microbianas. A remoção do metanol foi realizada e as microplacas foram secas a temperatura ambiente.

Após secagem total das microplacas, 200 µL de cristal violeta de Hucker 2% foram aplicados nas cavidades por 5 minutos para corar os microrganismos, e em seguida, as placas foram lavadas em água corrente e secas novamente a temperatura ambiente. A seguir, o biofilme foi ressuspensionado em 300 µL de ácido acético glacial, por 15 minutos, para assegurar a homogeneidade do material corado.

A leitura da absorbância foi realizada em aparelho de ELISA a 550 nm. Então, foi realizada a média aritmética dos valores de absorbância de cada amostra (DOa), comparado com a média da absorbância das cavidades contendo TSB estéril não inoculado (DO) e utilizada a classificação seguinte para determinar o grau de aderência: não aderente: $ODa \leq OD$; fracamente aderente: $DO < DOa \leq 2DO$; moderadamente aderente: $2DO < DOa \leq 4DO$; fortemente aderente: $4DO < DOa$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 12 sorovares testados apresentaram aderência a placa de poliestireno, em pelo menos uma condição de temperatura testada, como está representado na Tabela 2. A maior parte deles mostrou-se fracamente aderente nas diversas temperaturas de incubação. Assim como no estudo de OLIVEIRA et al. (2014), que avaliou a habilidade de formação de biofilmes de *Salmonella* sob diferentes temperaturas, nenhum sorovar foi fortemente aderente. Na temperatura de 25°C, que mimetiza a temperatura ambiente, foi possível observar que 50% dos isolados apresentou-se moderadamente aderente à placa de poliestireno.

Houve correlação com o estudo de RODRIGUES et al., (2009), que avaliou a capacidade de formação de biofilmes por *Salmonella* Heidelberg oriundas de abatedouros avícolas em microplacas de poliestireno, e obteve formação de biofilmes em todas as amostras testadas, diferenciando no fato de algumas amostras apresentarem-se fortemente aderentes. No estudo de SILVA et al., (2014), utilizando amostras de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola, também houve correlação com o presente estudo, onde a maior parte das amostras testadas apresentou-se fracamente aderente.

Assim como no estudo realizado por ZIECH (2015), O sorovar *S. Tiphymurium* ATCC 14028, utilizado como referência, demonstrou fraca adesão ao poliestireno.

Tabela 2: Aderência de sorovares de *Salmonella* spp. ao poliestireno.

Sorovares de <i>Salmonella</i> spp.	Adesão ao poliestireno				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
S. Brandenburg	Fraca	Fraca	Moderada	Fraca	Fraca
S. Anatum	Fraca	Moderada	Fraca	Fraca	Moderada
S. Tenesse	Fraca	Fraca	Moderada	Fraca	Fraca
S. Agona	Não aderente	Não aderente	Fraca	Não aderente	Não aderente
S. Bredeney	Fraca	Fraca	Moderada	Fraca	Fraca
S. Schwarzengrund	Fraca	Moderada	Moderada	Fraca	Fraca
S. Infantis	Fraca	Moderada	Moderada	Fraca	Fraca
S. Rissen	Não aderente	Não aderente	Fraca	Não aderente	Fraca
S. Lexington	Não aderente	Não aderente	Fraca	Não aderente	Fraca
S. Panamá	Moderada	Fraca	Moderada	Fraca	Não aderente
S. Typhimurium	Fraca	Fraca	Fraca	Moderada	Fraca
S. Gallinarum	Não aderente	Não aderente	Não aderente	Fraca	Fraca

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo denotam grande relevância, visto que todos os sorovares de *Salmonella* spp. avaliados aderiram ao poliestireno, e podem permanecer nas superfícies de manipulação de alimentos de abatedouros avícolas na forma de biofilmes e, conseqüentemente, serem transferidos para os alimentos.

5 REFERÊNCIAS

- BOYEN, F. et al. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 3-4, p. 187-195, 30 mar. 2009.
- COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual review of microbiology**, v. 41, p. 435-64, jan. 1987.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-93, abr. 2002.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-33, set. 2010.
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences Brazil, 2015. p. 888
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 49-79, jan. 2000.
- OLIVEIRA, D. C. V. et al. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 6, p. 478-83, jun. 2014.

- RODRIGUES, L. B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. December 2008, p. 225–230, 2009.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades-degradacoes-modificacoes**. São Paulo: Varela, 2006.
- SILVA, C. F. et al. *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. v. 55, n. November, p. 1–8, 2014.
- STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, n. 8, 2007.
- STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*, v. 56, p. 187–209, jan. 2002.
- ZIECH, R. E. **Caracterização de *Salmonella* sp. isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos**, 2015. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/37368>>. Acesso em: 20 abr. 2015