

Área: Tecnologia de alimentos

ADESÃO E REMOÇÃO DE BIOFILMES DE *Salmonella* Enteritidis PROVENIENTES DE SURTOS DE DTA EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL, POLIETILENO E POLIURETANO

Amauri Picollo de Oliveira^{1*}, Bruna Webber², Emanuele Serro Pottker², Eduarda Martelo¹, Luciane Daroit³, Fernando Pilotto⁴, Luciana Ruschel dos Santos^{1,2}, Laura Beatriz Rodrigues^{1,2}

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

²PPGBioexp, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

³Área de Estatística, Instituto de Ciências Exatas e Geoeconômicas, Universidade de Passo Fundo, RS

⁴Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

*E-mail: amauri_po@hotmail.com

RESUMO – Avaliou-se a capacidade da *Salmonella* Enteritidis formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, superfícies comumente utilizadas em abatedouros avícolas, e também o agente de sanitização mais eficaz para sua redução e/ou eliminação destes biofilmes. Corpos de prova das três superfícies foram colocados frente a duas cepas de *Salmonella* Enteritidis e incubados a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, por 0, 4, 8, 12 e 24 horas. Para higienização foram testadas águas estéreis aquecidas a 45°C e 85°C e soluções de amônia quaternária 1% e ácido peracético 0,5%. As duas cepas de *Salmonella* Enteritidis aderiram às três superfícies e houve formação de biofilmes em todas as temperaturas de incubação, 3±1°C, 9±1°C, 25±1°C, 36±1°C e 42°C±1°C. O ácido peracético 0,5% se mostrou o melhor tratamento na redução dos biofilmes nas amostras analisadas, ressaltando a importância de um eficaz processo de higienização na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Biofilmes, DTA, Higienização, *Salmonella* Enteritidis, Superfícies.

1 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* Enteritidis (SE) é uma das bactérias que mais causam doenças transmitidas por alimentos (DTA) em todo o mundo, estando relacionada frequentemente em surtos de origem alimentar, geralmente associados ao consumo de carne de aves e ovos, acarretando em prejuízos econômicos em vários países (WHO, 2012). Quando capazes de formar biofilmes em superfícies de contato, possuem maior chance de transmissão aos alimentos processados (VAN HOUTD; MICHIELS, 2010).

Por estes motivos, o controle da formação de biofilmes é importante para a segurança dos alimentos, devido à adesão das bactérias em superfícies e utensílios em contato com os alimentos e sua difícil remoção com agentes sanitizantes. Como estes biofilmes liberam células planctônicas, que são células que se desprendem dos biofilmes, estas células livres contaminam o alimento, estando os biofilmes associados aos surtos de doenças alimentares (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

A *Salmonella* Enteritidis é o principal sorovar isolado de humanos e alimentos e um dos principais isolados em animais, rações e amostras ambientais, além de ser um grande causador de infecções alimentares. Por este motivo, avaliou-se a sua habilidade em formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, em diferentes condições ambientais, assim como o agente de sanitização mais eficaz para a redução e/ou eliminação deste problema em abatedouros avícolas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas duas amostras de *Salmonella* Enteritidis, quanto à formação de biofilmes monoespécie, em corpos de prova com área de 1 cm² de superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, obtidos do ambiente de processamento de corte de aves. Ambas as cepas são provenientes de surtos, sendo uma isolada de fezes (coprocultura), identificada como SE 24 e a outra isolada de maionese com batatas, identificada como SE 69.

Os corpos de prova foram imersos em 2,75 mL de Caldo Triptona de Soja sem glicose (TSB), em microplacas de 12 poços, e em cada poço foi adicionado 250 µL com aproximadamente 10³ UFC/mL de cada cepa de *Salmonella* Enteritidis no volume final. Esta população foi verificada, em todos os experimentos, por semeadura em placas contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA). Os corpos de prova de cada material imersos na cultura de cada microrganismo foram incubados a 3±1°C (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C); 9±1°C (temperatura da sala de cortes para a União Europeia, máximo 10°C); 25±1°C (temperatura ambiente); 36±1°C (padrão ótimo para crescimento de mesófilos) e 42°C±1°C (temperatura de enriquecimento seletivo para *Salmonella* e, devido a posteriores estudos com bactérias termófilas, como *Campylobacter*, para pesquisa de biofilmes multiespécies), e nos tempos por 0, 4, 8, 12 e 24 horas, simulando os períodos para higiene pré-operacional e operacional em abatedouros de aves (ROSSONI; GAYLARDE, 2000; KUSUMANINGRUM et al., 2003). O experimento foi realizado em triplicata, e resultou em 1125 ensaios de formações de biofilmes nas três superfícies, para cada amostra de *Salmonella* Enteritidis, totalizando 2250 análises.

Nos tempos determinados, os corpos de prova de cada material com área de 1 cm² foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e lavados com 5 mL de Água Peptonada 0,1% com neutralizante (AP 0,1% com neutralizante), por cerca de 30 segundos, para a remoção de células planctônicas.

Após a remoção das células planctônicas, os corpos de provas foram submetidos aos tratamentos, exceto o controle. Os corpos de prova foram colocados em recipientes com 5 mL de água estéril aquecida a 45°C e a 85°C por 3 minutos, e em recipientes com 5 mL de solução de amônia quaternária 1% por 5 minutos e solução de ácido peracético 0,5% por 5 minutos.

Em seguida, os corpos de provas foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água Peptonada 0,1% (AP 0,1%) e imergidos em Banho de Ultrassom, frequência de 40 kHz e potência de 81 W, durante 10 minutos para a remoção de células sésseis, protocolo modificado a partir de Lindsay e von Holy (1997) e Parizzi et al. (2004). Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri contendo PCA e como alternativa para o método de espalhamento em superfície foi utilizado o método de contagem em gota (Drop Plate) para inoculação de microrganismos em placa, que foi dividida em setores e em cada setor foi inoculado cinco gotas de 10 µL de cada diluição da amostra. As placas foram incubadas a 37°C e a leitura foi realizada após 24 horas de incubação. O resultado obtido foi multiplicado por 20 para obtenção do número de células viáveis por mililitro. Após, para determinar o resultado, foi aplicada a fórmula:

$$UFC.cm^{-2} = \left(\frac{VD}{VA}\right) \cdot M \cdot \left(\frac{D}{A}\right)$$

Sendo:

V_D : volume do diluente utilizado na rinsagem (mL);

V_A : volume da alíquota utilizada na inoculação (mL);

M: média da contagem obtida nas placas em UFC;

D: diluição utilizada na contagem;

A: área do corpo de prova (cm²).

Os resultados foram convertidos em log e expressos em $\log_{10}UFC.mL^{-1}$ (GIBSON et al., 1999; CARELI, 2005).

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância. A comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As duas amostras de *Salmonella* Enteritidis foram capazes de formar biofilmes em todas as temperaturas avaliadas (42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C). Estes resultados são muito preocupantes para a indústria de alimentos, pois as SE foram capazes de formar biofilmes em temperaturas de refrigeração, 3°C e 9°C, mesmo sendo mesófilas com padrão ótimo de crescimento a 36°C.

Segundo Steenackers et al. (2012), o gênero *Salmonella* é capaz de formar biofilmes de forma significativa em diferentes tipos de materiais abióticos, como, plástico, borracha, vidro e aço inoxidável, ou bióticos, como plantas, células epiteliais e cálculos biliares, possuindo uma habilidade que contribui para a sua resistência e persistência em ambos os ambientes de instalação.

Os resultados das médias das repetições da quantificação da formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, frente aos tratamentos com água estéril aquecida a 45°C e a 85°C, e com os sanitizantes amônia quaternária 1% e ácido peracético 0,5%, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Média das repetições da quantificação da formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável, polietileno, poliuretano e poliuretano frente aos tratamentos rotineiros de higienização em abatedouros avícolas.

Tratamentos	Amostras	
	SE 24* (log ₁₀ UFC.mL ⁻¹)	SE 69** (log ₁₀ UFC.mL ⁻¹)
Controle	5,28 ^A	4,99 ^A
Água estéril aquecida a 45°C	4,95 ^A	4,45 ^B
Água estéril aquecida a 85°C	2,28 ^B	1,89 ^C
Amônia quaternária 1%	1,73 ^C	1,35 ^D
Ácido peracético 0,5%	0,94 ^D	1,06 ^D

*SE 24: amostra de coprocultura; **SE 69: amostra de maionese com batatas.

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na amostra SE 24 somente o tratamento com água estéril aquecida a 45°C não revelou diferença estatística frente ao controle, não demonstrando boa redução dos biofilmes formados por *Salmonella* Enteritidis nas três superfícies. Já os tratamentos com água estéril aquecida a 85°C e com os sanitizantes ácido peracético 0,5% e amônia quaternária 1%, revelaram diferença estatística frente ao controle, demonstrando maior eficácia sobre os biofilmes. Na amostra SE 69 os tratamentos com água estéril aquecida a 45°C e a 85°C, ácido peracético 0,5% e amônia quaternária 1% revelaram diferença estatística frente ao controle, demonstrando eficácia sobre os biofilmes formados por *Salmonella* Enteritidis. Não houve diferença estatística entre a amônia quaternária 1% e o ácido peracético 0,5%

Conforme recomendações da *American Public Health Association* (APHA, 2014), para que as superfícies sejam consideradas higienizadas os sanitizantes físicos ou químicos devem reduzir em até 2 UFC.cm⁻² o número de microrganismos das superfícies. Em superfícies aderidas, de acordo com a norma EN 13697:2001 do teste de superfícies da União Europeia, deve representar uma redução de no mínimo 4 log (União Europeia, 2001; Moretto et al., 2009). Os resultados das médias das repetições da redução da formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, frente aos tratamentos com água estéril aquecida a 45°C e a 85°C, e com os sanitizantes amônia quaternária 1% e ácido peracético 0,5%, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Média das repetições da redução da formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável, polietileno, poliuretano e poliuretano frente aos tratamentos rotineiros de higienização em abatedouros avícolas.

Tratamentos	Amostras	
	SE 24* (log ₁₀ UFC.mL ⁻¹)	SE 69** (log ₁₀ UFC.mL ⁻¹)
Água estéril aquecida a 45°C	0,33	0,54
Água estéril aquecida a 85°C	3,00	3,10
Amônia quaternária 1%	3,55	3,64
Ácido peracético 0,5%	4,34	3,93

*SE 24: amostra de coprocultura; **SE 69: amostra de maionese com batatas.

Na amostra SE 24 obtivemos uma redução de $4,34 \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ com 5 minutos de contato com o ácido peracético 0,5%, e a amônia quaternária 1% reduziu $3,55 \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$. A água estéril aquecida a 85°C com 3 minutos de contato reduziu $3,00 \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$. Já a água estéril aquecida a 45°C não atendeu as recomendações para higienização correta de uma superfície, com redução de somente $0,33 \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$.

Na amostra SE 69 obtivemos uma redução de $3,93 \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ com 5 minutos de contato com o ácido peracético 0,5%, e a amônia quaternária 1% reduziu $3,64 \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$. A água estéril aquecida a 85°C com 3 minutos de contato reduziu $3,10 \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$. Já a água estéril aquecida a 45°C não atendeu as recomendações para higienização correta de uma superfície, com redução de somente $0,54, \log_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$.

Destaca-se o fato de que o uso da água estéril aquecida a 45°C foi semelhante estatisticamente ao controle. Deste modo, conforme Contreras et al. (2003), deve-se ressaltar a necessidade do uso de pressão para a remoção dos resíduos, e o aquecimento adequado da água, para garantir a eficácia da etapa de pré-enxágue.

O ácido peracético 0,5% se mostrou o melhor tratamento utilizado na redução dos biofilmes na amostra SE 24, mas na amostra SE 69 não houve diferença estatística entre o ácido peracético 0,5% e a amônia quaternária 1% na redução dos biofilmes. Todavia, o ácido peracético 0,5% obteve a maior redução de biofilmes nas duas amostras, possuindo algumas vantagens em seu uso, como não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, ter baixo impacto ambiental e ser relatado como eficaz contra biofilmes (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Biofilmes formados por *Salmonella* spp. em equipamentos e superfícies de processamento de alimentos servem como um reservatório persistente de contaminação, comprometendo a segurança alimentar e a saúde humana (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010). Dessa forma, a sanitização na indústria avícola é um procedimento obrigatório e necessário, como verificado no presente trabalho, já que os sanitizantes apresentaram melhor ação na redução de biofilmes do que apenas o uso da água estéril aquecida a 45°C e a 85°C .

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que ambas as cepas de *Salmonella* Enteritidis foram capazes de formar biofilmes em diferentes temperaturas e superfícies comumente utilizadas em abatedouros avícolas, ressaltando a importância do controle de biofilmes bacterianos na indústria avícola, através de um processo de higienização eficaz. O ácido peracético foi o sanitizante mais eficaz. Destaca-se a formação de biofilme em baixas temperaturas, que amplia os riscos de contaminação cruzada durante o processamento de alimentos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à FAPERGS (Edital 001/2013 GR, Projeto: 1997-2551/13) pelo suporte financeiro para condução deste estudo, e também a CAPES/FAPERGS/UPF pela bolsa de estudos.

6 REFERÊNCIAS

- APHA, American Public Health Association. 2014. Disponível em: <<http://www.apha.org/>>. Acesso em: 04 set. 2015.
- CONTRERAS, C. J. et al. **Higiene e Sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. 180 p.
- GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41-48, 1999.
- LINDSAY, D.; von Holy, A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiol.** v. 14, p. 383-390, 1997.
- MORETRO, T. et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against Salmonella from the feed industry T. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, p. 1005-1012, 2009.
- PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.
- ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International journal of food microbiology**. v. 61, p. 81-85, 2000.
- STEENACKERS, H. et al. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.
- UNIÃO EUROPEIA. **NS-EN 13697:2001**: Quantitative Non-Porous Surface Test for the Evaluation of Bactericidal and / or Fungicidal Activity of Chemical Disinfectants used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas. Test Method and requirements without Mechanical Action. Brussels, Belgium: European Committee for standardization. Europa, 2001.
- VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surfasse. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117-1131, 2010.
- WHO, World Health Organization. **Top 15 lists from a Country, parameters**. 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/rDivVS>>. Acesso em: 10 nov. 2014.