

## Área: Tecnologia de alimentos

# BIOFILMES DE *Salmonella* Enteritidis EM AÇO INOXIDÁVEL SOB DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS

**Bruna Webber<sup>1\*</sup>, Emanuele Serro Pottker<sup>1</sup>, Eduarda Martelo<sup>2</sup>, Amauri Picollo de Oliveira<sup>2</sup>, Luciane Daroit<sup>3</sup>, Luciana Ruschel dos Santos<sup>1,2</sup>, Laura Beatriz Rodrigues<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>PPGBioexp, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

<sup>2</sup>PPGCTA, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

<sup>3</sup>ICEG, Instituto de Ciências Exatas e Geociências, Universidade de Passo Fundo, RS.

\*E-mail: brunahw@hotmail.com

**RESUMO** – A *Salmonella* spp. pode aderir e formar biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos que, uma vez formados, agem como pontos de contaminação constante e resistem consideravelmente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização. A aderência de microrganismos está intimamente relacionada com as propriedades da superfície testada. Dentre os materiais utilizados na indústria de alimentos, o aço inoxidável tem sido escolhido pela maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado aos outros metais e à ampla variedade de polímeros. Avaliou-se a capacidade de *Salmonella* Enteritidis (SE), provenientes de carne de aves e de ambiente de granjas de frangos de corte, formar biofilme em superfície de aço inoxidável e a remoção por diferentes processos de higienização. Cupons de aço inoxidável foram postos frente a duas cepas de SE (SE84 e SE106) e incubados a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C por 24 horas. Para higienização foram testadas águas estéreis aquecidas a 45°C e a 85°C e soluções de ácido peracético 0,5% e amônia quaternária 1%. As SE aderiram no aço inoxidável e houve formação de biofilmes em todas as temperaturas de incubação, sob temperatura de refrigeração (3°C e 9°C), temperatura ambiente (25°C), temperatura ótima de crescimento de microrganismos mesófilos (36°C) e temperatura de termotolerância de *Salmonella* (42°C). O ácido peracético e a água 85°C tiveram ação semelhante, seguido da amônia quaternária, mas a água a 45°C não foi eficaz. Estes resultados podem impulsionar as estratégias de controle de biofilmes, aprimorando as condições higiênico-sanitárias destes estabelecimentos.

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

## 1 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* Enteritidis (SE) vem se destacando como o sorotipo mais comum nos seres humanos, sendo a principal causadora de surtos de doenças transmitidas por alimentos (MILJKOVIC-SELIMOVIC et al., 2010).

Uma das preocupações é a formação de biofilmes que, uma vez constituídos, agem como pontos de contaminação constante (FUSTER-VALLS et al., 2008).

A *Salmonella* spp. adere e forma biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos, como aço inoxidável (MANIJEH et al., 2008). Além disso, microrganismos na forma sésil resistem consideravelmente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização, que consistem no uso de água quente, detergentes e sanificantes, visando reduzir os microrganismos até níveis seguros e obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (COSTERTON et al., 1995).

Deste modo, avaliou-se a capacidade da SE formar biofilme em superfície de aço inoxidável usada comumente na indústria de alimentos, sob diferentes temperaturas que mimetizam as condições ambientais de um abatedouro de aves, e diferentes processos de higienização para sua remoção.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas duas amostras de *Salmonella* Enteritidis (SE) quanto à formação de biofilmes mono-espécie, previamente isoladas e confirmadas geneticamente por MicroArray (Check&Trace®). Dessas, uma cepa é proveniente de cortes de aves destinados ao consumidor e não envolvidos em surtos, denominada SE 84, e a outra oriunda de *swabs* de arrasto de ambiente de granja de frangos de corte, denominada SE 106.

Para a formação dos biofilmes os corpos de prova de aço inoxidável AISI 316, com área de 1cm<sup>2</sup>, foram cultivados individualmente em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços. Foram adicionados 2,75 mL de caldo tripton de soja sem glicose e 250 µL de culturas individuais de cada SE para obtenção de concentração final de 10<sup>3</sup>UFC/mL; incubados a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, simulando as temperaturas do ambiente de processamento, por 24 horas. Todos os ensaios foram realizados com três repetições. Resultou em 375 ensaios de formações de biofilmes no aço inoxidável em todas as temperaturas, para cada amostra de SE, totalizando 750 análises.

Nos tempos determinados, os cupons foram retirados dos meios de cultivo e imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1%, por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água Peptonada 0,1%, e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom (frequência de 40 kHz e potência de 81 W) para desadesão de células sésseis (SCHERBA et al. 1991). Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri contendo Agar PCA e utilizado o método de contagem em gota (drop plate), com leitura após 24 horas de incubação a 36±1°C.

A eficácia dos tratamentos para remoção dos biofilmes formados no aço inoxidável foi testada. Para higienização, os cupons permaneceram por 3 minutos em água estéril aquecida a 45°C, e a 85°C, e nas soluções de ácido peracético 0,5% e amônia quaternária 1%, por 5 minutos.

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. A análise estatística foi feita utilizando o software ASSISTAT versão 7.7 beta.

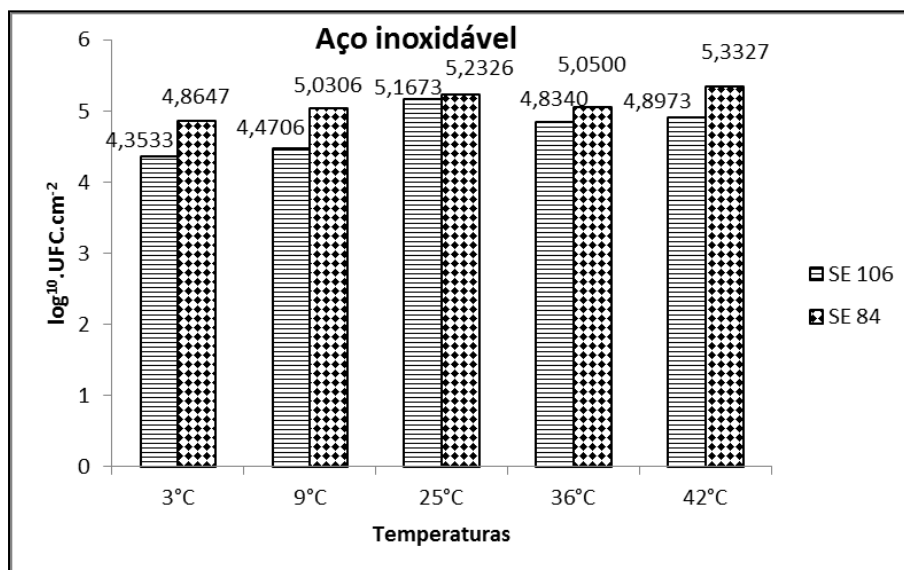
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No aço inoxidável, superfície amplamente utilizada em indústrias de alimentos, a SE 84 obteve maior adesão quando comparada a SE 106 (**Figura 1**), com diferença estatística ( $P=0,0338$ ). Ao analisarem os genes de virulência dessas SE, Silva (2014) observou que somente a SE 84 possuía o gene *spiA* em seu perfil genético, esse envolvido na formação de biofilmes (DONG et al., 2011).

Segundo Ronner e Wong (1993), para caracterizar a formação de biofilme é necessário um número mínimo  $10^3$  UFC aderidas por  $\text{cm}^2$  ( $3 \log^{10} \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Sendo assim, ambas as cepas estudadas formaram biofilmes em todas as temperaturas avaliadas (**Figura 1**).

Além disso, não houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) entre a formação de biofilmes em todas as temperaturas de incubação,  $3^\circ\text{C}$ ,  $9^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $36^\circ\text{C}$  e  $42^\circ\text{C}$ . As SE tiveram a mesma formação em temperaturas de conservação sob refrigeração e temperaturas ótimas. Houve maior formação de biofilme com o aumento da temperatura de incubação. Ressaltamos que a temperatura de  $3^\circ\text{C}$  não é até então descrita como propícia para o desenvolvimento de *Salmonella* spp. Tortora et al. (2012) colocam que a temperatura mínima de crescimento é  $5^\circ\text{C}$  e a ótima é  $37^\circ\text{C}$  (**Figura 1**).

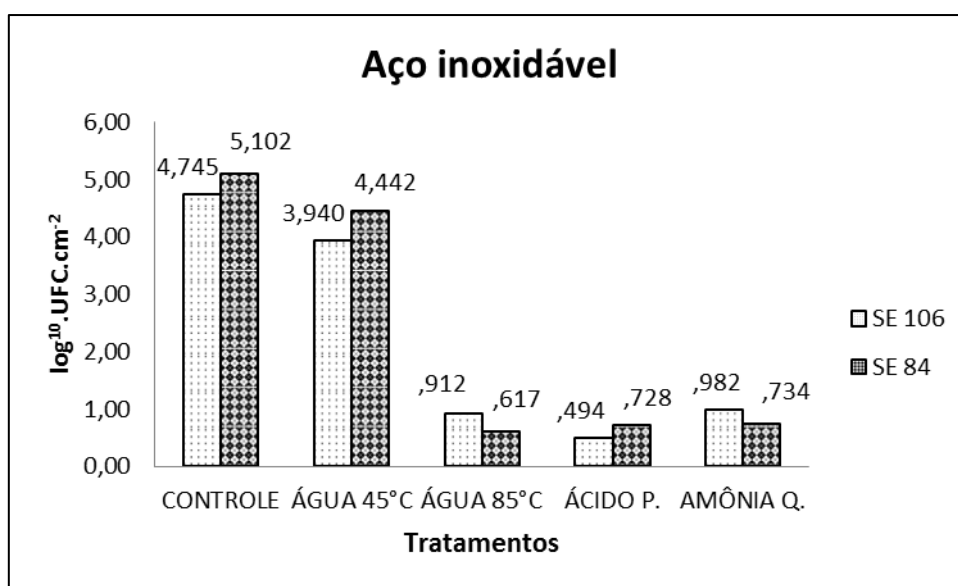
**Figura 1.** Formação de biofilmes de SE 106 e SE 84 sob diferentes temperaturas de incubação.



Dentre os materiais mais utilizados na indústria de alimentos, o aço inoxidável tem sido o material de escolha por ter uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção e por ser resistente a oxidação e corrosão (HOLAH; THORPE, 1990). Por serem superfícies menos irregulares, demonstra uma maior adequação na indústria e frente a processos de higienização. Porém, o uso do aço inoxidável fica limitado devido ao alto custo e a pouca flexibilidade do material (ROSSONI; GAYLARDE, 2000). Preocupa-se com o crescimento de biofilme no aço inoxidável a  $3^\circ\text{C}$ , ambiente encontrado na refrigeração de abatedouros de aves, em locais como o chiller.

Conforme recomendações do teste de superfícies da União Europeia, para que as superfícies sejam consideradas higienizadas deve haver redução dos microrganismos de no mínimo 4 log (MORETTO et al., 2009). Obtivemos, com o ácido peracético e a água estéril aquecida a 85°C, uma redução média de 4,3125  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup> e 4,159  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>, respectivamente, e a amônia quaternária promoveu uma remoção de 4,065  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>, também sendo uma opção efetiva. Em contrapartida a água estéril aquecida a 45°C não atendeu as recomendações, reduzindo somente 0,732  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>, ressaltando a necessidade do uso de pressão com a água a 45°C (CONTRERAS et al., 2003), garantindo assim a etapa de pré-enxágue na etapa de higiene operacional (**Figura 2**).

**Figura 2.** Tratamentos na remoção do biofilme.



Legenda: Água 45°C = água estéril aquecida a 45°C; Água 85°C = água estéril aquecida a 85°C; ÁCIDO P. = ácido peracético 0,5%; AMÔNIA Q. = amônia quaternária 1%.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o aço inoxidável, material amplamente utilizado na indústria de alimentos, propiciou a aderência de SE nas diferentes condições ambientais. Enfatiza-se a formação de biofilme em baixas temperaturas, possibilitando uma potencial contaminação cruzada durante o processamento e a conservação de alimentos. O ácido peracético e a amônia quaternária demonstraram ser uma boa opção na escolha do sanitizante, e o uso de água aquecida a 85°C também foi efetivo na redução microbiana. A água aquecida a 45°C não atendeu as recomendações de higienização de superfícies, ficando muito próximo do controle.

## 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

- CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e Sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, p. 180, 2003.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWAKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilmes. **Annual Review of Microbiology**. v. 49, p. 711-745, 1995.
- DONG, H.; PENG, D.; JIAO, X.; ZHANG, X.; GENG, S.; LIU, X. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. **Microbiology**. v. 157, p. 1798-1805, 2011.
- FUSTER-VALLS, N. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**. v. 19, p. 308-314, 2008.
- HOLAH, J. T., THORPE, R. H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Microbiology**. v. 69, p. 599-608, 1990.
- MANIJEH, M; MOHAMMAD, J.; ROHA, K. K. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. **Journal of Biological Science**. v. 8, p. 502-505, 2008.
- MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; BABIC, T.; STOJANOVIC, P. *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis – actualities and importance. **Acta Medica Medianae**. v. 49, p. 71-75, 2010.
- MORETRO, T.; VESTBY, L. K.; NESSE, L. L.; STORHEIM, S. E.; KOTLARZ, K.; LANGSRUD, S. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, p.1005-1012, 2009.
- RONNER, A. B.; WONG A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**. v. 56, p. 750-758, 1993.
- 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, 200.
- SCHERBA, G.; EIGEL R.M.; O'BRIEN W.D. "Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy". **Applied and Environmental Microbiology**. v.57 n.7, p. 2079-2084, 1991.
- SILVA, C. F. Padrão de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilme. 2014. Passo Fundo, 90f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Curso de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo.
- TORTORA, G.R. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.