

Área: Tecnologia de alimentos

***Salmonella* Enteritidis EM POLIETILENO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E TRATAMENTOS PARA REMOÇÃO DE BIOFILMES**

Bruna Webber^{1*}, Emanuele Serro Pottker¹, Amauri Picollo de Oliveira², Juliana Orsato³, Luciane Daroit⁴, Luciana Ruschel dos Santos^{1,2}, Laura Beatriz Rodrigues^{1,2}

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

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

³Bióloga, Autônoma, Bolsista do CNPq na modalidade AT-NS.

⁴ICEG Instituto de Ciências Exatas e Geociências, Universidade de Passo Fundo, RS.

*E-mail: brunahw@hotmail.com

RESUMO – A *Salmonella* Enteritidis (SE) vem se destacando como o sorotipo mais comum nos seres humanos em âmbito mundial, sendo o principal causador de surtos de doenças transmitidas por alimentos. A *Salmonella* spp. pode aderir e formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos e agir como pontos de contaminação constante, pois microrganismos na forma séssil resistem significativamente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização, para obtenção de produtos de boa qualidade higiênico-sanitária. O polietileno usado nas placas de corte é de natureza polimérica e apresenta superfícies irregulares, facilitando a deposição de material orgânico dificultando a ação dos agentes desinfetantes. Avaliou-se a capacidade da SE formar biofilme em superfície de polietileno usada na indústria de alimentos e processos de higienização. Cupons de polietileno 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 85°C e soluções de ácido peracético 0,5% e amônia quaternária 1%. As SE aderiram no polietileno e houve formação de biofilmes em todas as temperaturas, ressaltando a 3°C, temperatura ainda não citada para adesão de SE. O ácido peracético e a água 85°C tiveram ação semelhante, seguido da amônia quaternária, já a água a 45°C não foi eficaz. A avaliação de formação de biofilme e a mimetização de procedimentos de higiene nessa superfície são de grande relevância por auxiliar a indústria avícola a ter um maior conhecimento das reais condições dos abatedouros no Brasil.

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

1 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* Enteritidis (SE) vem se destacando há vários anos como o sorotipo mais comum nos seres humanos. É considerada um dos enteropatógenos humanos mais frequentemente associados ao trato digestório das aves, originando-se de diferentes fontes do ambiente avícola. Produtos como ovos e carne são os mais comumente causadores de gastroenterite, sendo responsáveis por até 47% do total das infecções, e a SE a principal causadora desses surtos (CARDOSO et al. 2000; CDC 2013; MILJKOVIC-SELIMOVIC et al., 2010). Com isso se torna essencial o seu controle em abatedouros avícolas, por possuir relevância como causadora de doenças veiculadas por alimentos.

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. pode aderir e formar biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos, como o polietileno, usado nas placas de corte em frigoríficos no Brasil. Microrganismos na forma sésil resistem significativamente 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).

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar se temperaturas de refrigeração (3°C e 9°C), ambiente (25°C), ótima (36°C) e de termotolerância (42°C) influenciam a formação de biofilmes por SE na superfície de polietileno e também diferentes tratamentos de 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 ambientes de frangos de corte, denominada SE 106.

Para a formação dos biofilmes os corpos de prova de polietileno, com área de 1cm², foram cultivados individualmente em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços. Foi adicionado 2,75 mL de caldo triptona de soja sem glicose e 250µL de culturas individuais de cada SE para obtenção de concentração final de 10³UFC/mL. As microplacas foram incubadas 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 polietileno 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 37°C.

A eficácia dos tratamentos foi testada sobre os biofilmes formados no polietileno. Para os tratamentos de 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

A SE 84 obteve maior adesão no polietileno, quando comparada a SE 106 (**Figura 1**), com diferença estatística ($P=0,0338$). Por ser de natureza polimérica e com maior manipulação, essa superfície pode apresentar irregularidades que facilitam a adesão dos microrganismos e dificultam a ação dos agentes desinfetantes. Além disso, ao analisarem os genes de virulência dessas SE, Silva (2014), observou que somente a SE 84 possuía o gene *spiA* em seu perfil genético. Este gene foi descrito como um dos envolvidos na formação de biofilmes por *Salmonella* spp. (DONG et al., 2011).

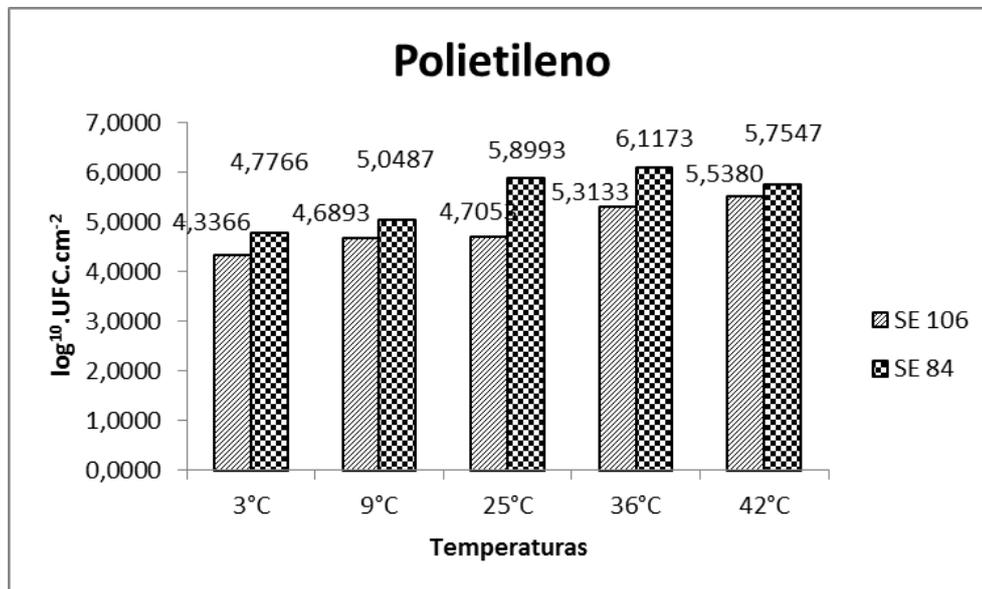
Segundo Ronner e Wong (1993), para caracterizar a formação de biofilme são necessários um número mínimo 10^3 UFC aderidas por cm^2 ($3 \log^{10} \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$). Sendo assim, ambas as cepas estudadas formaram biofilmes no polietileno, em todas as temperaturas avaliadas.

As SE 84 e SE 106 possuem a mesma capacidade de formar biofilmes 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). Ressaltamos que o crescimento a 3°C, temperatura de refrigeração, não foi até então descrita como propícia para o desenvolvimento de *Salmonella* nessa superfície (**Figura 1**).

Está documentado por diferentes autores que o gênero *Salmonella* não possui habilidade de crescimento abaixo de 5°C (MOREY & SINGH 2012, TORTORA et al., 2012, GAST 2008). Tortora et al. (2012) colocam que a temperatura mínima de crescimento da *Salmonella* é 5°C e a temperatura ótima é de 37°C. Morey & Singh (2012) salientam que já está bem documentado que a *Salmonella* não cresce entre 4°C e 8°C.

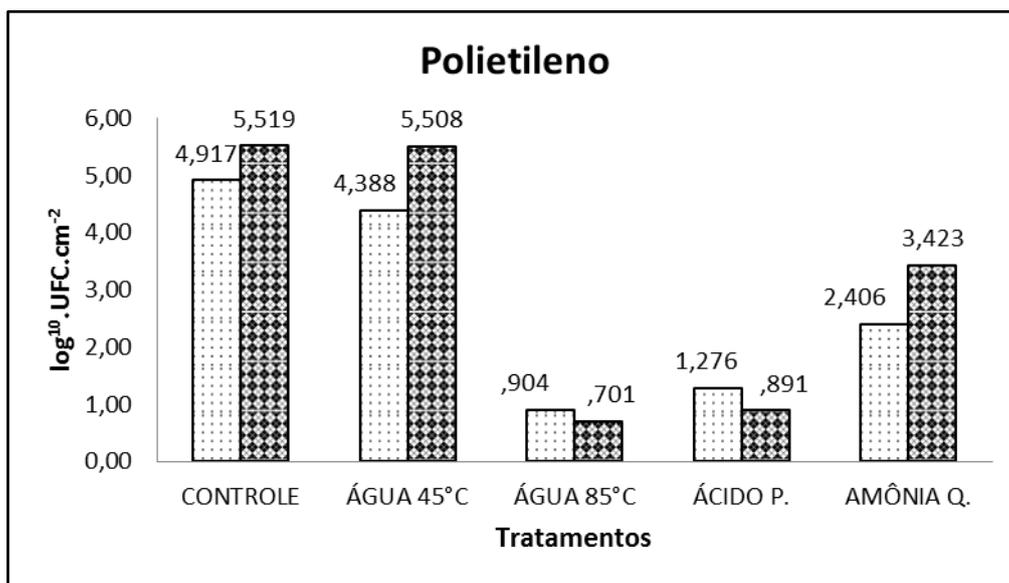
O desenvolvimento em temperaturas de refrigeração deve ser investigado, já que é considerado um ponto crítico durante a produção e conservação de alimentos (LIMA et al., 2004).

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



Para que as superfícies sejam consideradas higienizadas os sanitizantes devem reduzir os microrganismos em no mínimo 4 log, conforme recomendações do teste de superfícies da União Européia (UE) (MORETTO et al., 2009). Obtivemos, com o ácido peracético e com a água a 85°C, uma redução média de 4,13 log¹⁰.UFC.cm⁻² e 4,42 log¹⁰.UFC.cm⁻², respectivamente. A amônia quaternária obteve uma remoção de 2,32 log¹⁰.UFC.cm⁻², não sendo considerada efetiva nesta superfície, segundo a UE (Figura 2).

Figura 2. Tratamentos na remoção do biofilme.



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

A água a 45°C também não atendeu as recomendações, reduzindo somente 0,27 log¹⁰.UFC.cm⁻². Destaca-se o fato de que o uso da água 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, além do aquecimento da água a esta temperatura, garantindo assim a eficiência da etapa de pré-enxágue.

A resistência dos microrganismos à desinfecção é frequentemente associada com a presença de biofilmes em superfícies (BRESSLER et al., 2009). Os biofilmes constituem uma forma privilegiada de vida para as bactérias, e uma compreensão mais clara dos processos envolvidos em sua resistência a desinfetantes é crucial para o seu controle.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o polietileno, material amplamente utilizado na indústria de alimentos, propicia a aderência das duas cepas de SE sob todas as temperaturas testadas. Ressaltamos a capacidade de formação de biofilme em baixas temperaturas, pois nas salas de cortes as placas de polietileno são mantidas nestas temperaturas, possibilitando crescimento microbiano e contaminação cruzada. O ácido peracético foi a melhor opção para a sanitização desta superfície, seguido do uso de água aquecida a 85°C. A amônia quaternária não foi efetiva. O uso de água aquecida a 45°C, sem o uso de pressão, não atendeu as recomendações de higienização.

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

- BRESSLER, D. C.; BALZER, M.; DANNEHL, A.; FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. **Water Science and Technology**. v. 9, p. 81-87, 2009.
- CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.67, p.1. 2000.
- CDC: **Center for Disease Control**. Making Food Safer to Eat: Reducing contamination from the farm to the table. [Internet]. [cited 2015 jun 3] Available from: <<http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/>>. 2013.

- 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.
- GAST, R. K. *Salmonella* infections – Paratyphoid Infections. In: Saif, Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.A. (eds.). **Diseases of Poultry**. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA. p. 636-665, 2008.
- LIMA, E.S.C.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J.L.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMEIDA, L.P.; PINTO, M.S.; DIAS, F.S. Isolation of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* at swine slaughtering as subsidy for HACCP, the Hazard analysis and critical control point system. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.24, p.185-190, 2004.
- 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, n. 3, p.1005-1012, 2009.
- MOREY, A.; SINGH, S. Low-Temperature Survival of *Salmonella* spp. in a Model Food System with Natural Microflora. *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 9, p.218-223, 2012.
- 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.
- 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.