

Área: Tecnologia de alimentos

VÓRTEX E ULTRASSOM PARA REMOÇÃO *in vitro* DE BIOFILMES DE *Salmonella* spp.

Bruna Webber¹, Amauri Picollo de Oliveira^{2,*}, Carolina Griesang Schenkel³, Luciane Daroit⁴, Fernando Pilotto³, 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

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

⁴Área de Estatística, Instituto de Ciências Exatas e Geoeconômicas, Universidade de Passo Fundo, RS

*E-mail: amauri_po@hotmail.com

RESUMO – A presença de biofilmes é comum em todos os tipos de superfícies. Métodos laboratoriais vem sendo utilizados e testados *in vitro* para remoção e posterior quantificação de biofilmes, entre eles o uso de vórtex e ultrassom. O objetivo foi avaliar a eficácia desses dois métodos laboratoriais para remover biofilmes de *Salmonella* spp., cultivadas *in vitro*, em superfície de aço inoxidável proveniente da indústria de alimentos. Na etapa de formação de biofilmes analisou-se três amostras, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e uma *S. Enteritidis* SE106. Corpos de provas de aço inoxidável de 1 cm² foram imersos em caldo TSB sem glicose juntamente com cada microrganismo e incubados a 36°C por 24 h. Na etapa de remoção, utilizaram-se duas metodologias, o turbilhonamento com vórtex por 2 min e o método de sonicação por 10 minutos em banho de ultrassom (40 kHz). Diluições seriadas foram feitas e transferidas para ágar PCA para quantificação em log₁₀UFC.mL⁻¹. Foi realizada a microtopografia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies antes da etapa de remoção. Nos resultados obtidos, não houve diferença significativa entre os dois métodos de remoção e entre as três cepas estudadas ($P > 0.05$). Apesar de não haver diferença estatística entre os métodos testados, o uso do ultrassom, em frequência moderada e por 10 minutos, será utilizado como padrão para a desadesão dos biofilmes formados *in vitro*, devido à facilidade de uso e às suas propriedades hidrodinâmicas que desestabilizam a estrutura do biofilme.

Palavras-chave: Biofilmes, *Salmonella*, Ultrassom, Vórtex.

1 INTRODUÇÃO

A presença de biofilmes é comum em todos os tipos de superfícies (ROSSONI; GAYLARDE, 2000), pois sofrem desgastes com o uso e aumentam a possibilidade do acúmulo de sujidades e bactérias (HOLAH; THORPE, 1990). Uma vez constituídos, agem como pontos de contaminação constantes, liberando fragmentos ou células planctônicas de microrganismos, como *Salmonella* spp., podendo comprometer a qualidade

microbiológica de produtos (FUSTER-VALLS, 2008). Dentre os materiais mais utilizados em equipamentos, o aço inoxidável tem sido o material de escolha devido à sua resistência à corrosão e oxidação, por ter maior durabilidade e facilidade no processo de limpeza e desinfecção (HOLAH; THORPE, 1990; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Métodos laboratoriais estão sendo utilizados e testados *in vitro* para remoção e posterior quantificação de biofilmes, entre eles, o vórtex e o ultrassom (LINDSAY; HOLY, 1997; BERMEJO, 2012). O vórtex é uma metodologia muito usada em estudos de biofilmes, e atua por movimentos de turbilhonamento, através do efeito do movimento do fluxo da água. Como resultado remove ou reduz a adesão dos microrganismos em uma superfície (PARIZZI, 2004). O ultrassom, quando usado em frequência moderada (entre 20 kHz e 40 kHz), atua desaglomerando agregados bacterianos através de efeitos físicos, químicos e mecânicos, resultantes de cavitação acústica (MASON et al., 2003).

Com esse intuito, buscou-se avaliar a eficácia de dois métodos laboratoriais, turbilhonamento (vórtex) e sonicação (banho de ultrassom), para remover biofilmes de *Salmonella* spp., cultivadas *in vitro*, em superfície de aço inoxidável proveniente da indústria de alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Três cepas de *Salmonella* spp. foram analisadas quanto à formação de biofilmes: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e um isolado de *S. Enteritidis*, denominada SE106, proveniente de *swab* de arrasto de granja de frangos de corte e com sorovar confirmado geneticamente por Microarray pelo equipamento Check&Trace. As três cepas foram reativadas e confirmadas com testes bioquímicos e sorológicos.

Para a formação de biofilmes utilizou-se microplacas de poliestireno de 12 poços, onde foram colocados 2,75 mL de TSB sem glicose em cada poço com o cupom de aço inoxidável de 1cm² e adicionados 250 µL com aproximadamente 10³ UFC/mL de concentração final de cada cepa, incubados por 36°C por 24 h. Todos os testes foram realizados com 6 repetições para cada microrganismo em cada método de remoção. Cada cupom foi retirado com pinça estéril e imerso em 5 mL de água peptonada (AP) a 0,1% por 1 min para remoção de células planctônicas. Após, o cupom foi transferido para outro tubo com 10 mL de AP 0.1% para remoção das células sésseis.

Após a formação do biofilme, na etapa de remoção, utilizaram-se duas metodologias: turbilhonamento por vórtex, segundo Parizzi (2004), e sonicação com uso do banho de ultrassom, segundo Scherba et al. (1991). Para remoção com o método do vórtex foi realizada agitação por 2 min. Para o método de remoção por sonicação os cupons foram mantidos por 10 min em banho de ultrassom (frequência 40 kHz, potência 81 W). Diluições seriadas foram feitas e transferidas para ágar PCA (padrão de contagem) para quantificação pelo método drop plate, onde dividiu-se a placa em setores e inoculou-se cinco gotas de 10 µL de cada diluição. Essas placas foram incubadas em estufas a 36°C por 24 h. 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:

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

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 (cm^2). Os resultados foram convertidos em log e expressos em $\log_{10}\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (GIBSON et al., 1999; CARELI, 2005). A microtopografia das superfícies com o biofilme formado foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

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 três cepas de *Salmonella* spp. testadas formaram biofilme após 24 h de incubação em aço inoxidável, como pode ser visto na Figuras 1. Após a remoção e quantificação, verificou-se que não houve diferença significativa entre os dois métodos de remoção, vórtex e ultrassom ($P > 0.05$). Também não houve diferença significativa entre as *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Enteritidis* SE106 nas contagens da remoção do biofilme, conforme a Tabela 1, o que confirma a semelhança entre os dois métodos e entre as cepas estudadas.

Figura 1. Superfície de aço inoxidável com formação de biofilme por *S. Enteritidis*.

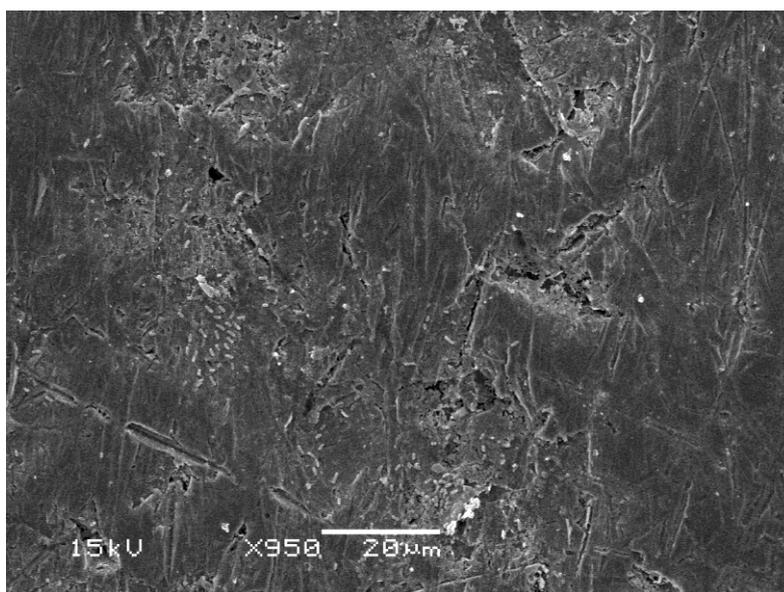


Tabela 1. Análise dos métodos vórtex e ultrassom na remoção in vitro de biofilmes formados por *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Enteritidis SE106.

AMOSTRAS	VÓRTEX (\log_{10} UFC/ cm^2)	ULTRASSOM (\log_{10} UFC/ cm^2)
<i>S. Typhimurium</i>	7,0264 A a	7,6297 A a
<i>S. Enteritidis</i>	7,2717 A a	7,6831 A a
<i>S. Enteritidis</i> SE106	7,1681 A a	7,2092 A a

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

Pesquisas envolvendo estudos com a formação de biofilmes microbianos se tornam cada vez mais presentes e métodos laboratoriais são utilizados para a remoção *in vitro* destes biofilmes para posterior quantificação, entre eles o vórtex e o ultrassom (BERMEJO, 2012).

O vórtex atua através de movimentos típicos de turbilhão, através do efeito do movimento do fluxo da água, e como resultado remove ou reduz a adesão dos microrganismos em uma superfície (PARIZZI, 2004). O ultrassom apresenta o efeito de cavitação, que é a formação de cavidades ou bolhas no meio líquido, gerando certa quantidade de gás, que pode acarretar mudança estrutural ou funcional das células devido ao rompimento de ligações moleculares (DOMINGOS, 1998). Scherba et al. (1991) demonstraram que as propriedades hidrodinâmicas do ultrassom desestabilizam a estrutura do biofilme em uma frequência de 26 kHz e, quanto maior a intensidade e o tempo de exposição, maior é a quebra do biofilme.

A sonicação é capaz de inativar as bactérias quando usado em altas frequências (512 kHz e 850 kHz). Porém, quando usado em frequência moderada (entre 20 kHz e 40 kHz), atua desaglomerando agregados bacterianos através de efeitos físicos, químicos e mecânicos resultantes de cavitação acústica (MASON et al., 2003). Esses processos são responsáveis pela limpeza das superfícies com presença de partículas aderidas.

Equipamentos ultrassônicos têm sido utilizados para estimar a contaminação microbiana de superfícies. Contudo, estas devem ser pequenas o bastante e removíveis para que possam ser colocadas imersas em diluente e colocadas no aparelho ultrassônico, onde a energia gerada resultará na liberação dos microrganismos (JAY, 2005). Vale destacar também a facilidade do uso do banho de ultrassom pelo pesquisador em comparação ao vórtex na remoção *in vitro* dos biofilmes.

Ali et al. (2006) testou remoção de biofilmes em banho de ultrassom em diferentes tempos, e selecionou 10 minutos para todos os testes, uma vez que a recuperação das células com esse tempo era consistente e suficientemente elevada e, ao mesmo tempo, reduzia a possibilidade de danos às células causadas por sonicação prolongada.

Partindo desta premissa, o ultrassom, quando usado na frequência e tempo correto, se torna um ótimo método para a desadesão dos biofilmes formados *in vitro*, principalmente pelas suas propriedades que desestabilizam o biofilme e pela facilidade de uso.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que, apesar de não haver diferença estatística entre os métodos testados, o uso do ultrassom, com frequência de 40 kHz por 10 minutos, será utilizado como padrão para a desadesão dos biofilmes formados *in vitro*, devido à facilidade de uso e às suas propriedades hidrodinâmicas que desestabilizam a estrutura do biofilme.

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

- ALI, L. et al. Investigating the suitability of the Calgary Biofilm Device for assessing the antimicrobial efficacy of new agents. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 1887-1893, 2006.
- BERMEJO, L. J. **Ação do ultrassom na remoção do biofilme dos reservatórios de água dos equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade de São Paulo, Bauru, 2012.
- CARELI, R. T. **Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- DOMINGOS, R. N. Contribuições e usos do ultra-som de média intensidade no preparo de catalizadores e produção ativada de etanol. 1998. Tese (Livre-Docente em Termodinâmica), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, **Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, 1998.
- FUSTER-VALLS, N. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**. v. 19, p.308-314, 2008.
- GIBSON, H. 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.
- 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.
- JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- LINDSAY, D.; HOLY, A. V. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**. v. 14, p. 383-390, 1997.
- MASON, T. J. et al. Potential uses of ultrasound in the biological decontamination of water. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 10, p. 319-323, 2003.
- PARIZZI, S. Q. F. 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.
- SCHERBA, G. et al. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, p. 2079-2084, 1991.