

## PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Salmonella* ISOLADAS DE LINGUIÇAS FRESCAIS

MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA<sup>1</sup>; SUELEN MEDEIROS FURTADO<sup>2</sup>; YURI MARQUES LEIVAS<sup>3</sup>; GIOVANNI BETTIN ANSELMO<sup>4</sup>, EDUARDA HALLAL DUVAL<sup>5</sup>; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - sueleen\_me@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – yurimarquesleivas@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – giovanni.anselmo@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – eduardahd@hotmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

### INTRODUÇÃO

As bactérias presentes nos alimentos, além de favorecerem a deterioração e/ou redução da vida útil desses produtos, podem veicular patógenos, trazendo riscos à saúde do consumidor. Assim, a higiene correta no processamento e manipulação desses alimentos é necessária para garantir sua segurança em todos os estágios de produção minimizando a preocupação com a saúde pública. Falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação na indústria de alimentos. Os micro-organismos podem aderir às superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando a multiplicação celular (OLIVEIRA et al., 2006).

Biofilme corresponde a uma comunidade de células sésseis aderidas a um substrato, imbebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, no qual exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. Este tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de micro-organismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e favorecer resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003). A adesão microbiana ocorre devido à deposição de micro-organismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam o seu desenvolvimento. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, estabelece-se o biofilme (MARQUES, 2005).

Micro-organismos saprófitas e patogênicos são capazes de participar com maior ou menor intensidade no processo de adesão e na formação de biofilme. Bactérias do gênero *Salmonella* spp. estão entre os principais micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos (CDC, 2011). A transmissão a humanos ocorre geralmente pelo consumo de alimentos contaminados. Alimentos de origem animal são os principais responsáveis pela distribuição deste patógeno (CASTANHA et al., 2004, DIAS et al., 2008). Baseado no exposto, o estudo teve por objetivo verificar a capacidade de *Salmonella*, isoladas de linguiças frescas, formar biofilme.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Preparo do Inóculo

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas – UFPel. Foram utilizadas 11 cepas de *Salmonella* spp., isoladas de linguiças frescas. Os isolados foram estocados em glicerol a -18°C.

#### 2.2. Ensaio de Formação de Biofilme

O procedimento adotado para realizar este ensaio segue o recomendado por STEENACKERS et al. (2011), com algumas modificações. Inicialmente, foram colocados 200  $\mu$ L de caldo Trypticase de Soja (TSB, Acumedia) em cada poço de uma placa de 96 cavidades (Nunc, Thermo Scientific, Denmark) adicionados de 8  $\mu$ L de culturas *overnight* em TSB de cada cepa padronizada em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,9-1,0 de densidade ótica (DO). Poços com 200  $\mu$ L de caldo TSB, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Então, a tampa foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C sem agitação. Após, as tampas das placas (Nunc-TSP, Thermo Scientific, Denmark) foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (Phosphate Buffered Saline – PBS) e coradas com cristal violeta (isopropanol, metanol e PBS, v/v: 1:1:18) por 30 minutos. Após, estas foram lavadas com água destilada estéril, secas a temperatura ambiente por 30 minutos e colocadas em ácido acético a 30%. Esta última etapa é realizada para que o biofilme formado na tampa se solte e fique no meio. Após a remoção da tampa, a leitura por densidade ótica utilizando um espectrofotômetro foi realizada, utilizando um comprimento de onda de 600nm e de 570nm. O caldo TSB estéril foi utilizado como controle negativo e o controle positivo foi uma cepa de *Staphylococcus coagulase* positiva fortemente formadora de biofilme. Os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras. A partir, as cepas foram classificadas segundo a aderência na tampa da placa e foram divididas em quatro categorias. Como o experimento foi realizado em triplicata, os resultados foram expressos pela média dos valores obtidos e cada cepa foi agrupada nas quatro categorias selecionada segundo o estipulado por STEPANOVIC et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das densidades óticas (DOS) dos controles e a classificação foi determinada conforme segue.  $DO \leq DOc =$  não formadora;  $DOc < DO \leq 2 \times DOc =$  fraca formadora;  $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc =$  moderada formadora;  $4 \times DOc < DO =$  forte formadora.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 11 cepas testadas, todas (100%) foram formadoras de biofilme, sendo cinco (45,4%) consideradas fortes formadoras, cinco (45,4%) moderadamente formadoras e uma (9,2%) fraca formadora, conforme pode ser observado na Tabela 1. Os resultados obtidos neste experimento diferem dos encontrados por outros pesquisadores. RODRIGUES et al (2009), avaliaram a formação de biofilme em placas de poliestireno em 15 cepas de *Salmonella* Heidelberg, isoladas em um abatedouro avícola e uma cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e verificaram que apenas duas (12,5%) eram fortemente formadoras e 14 fracamente formadoras de biofilme (87,5%).

STEPANOVIC et al. (2004) testaram a formação de biofilme em 122 cepas de *Salmonella* cultivadas em quatro diferentes meios e os resultados revelaram que todas as cepas analisadas formaram biofilme. Resultado este também observado neste experimento. No trabalho de STEPANOVIC et al. (2004), a média da densidade ótica obtida em todas as cepas analisadas foi de 0,297, sendo esta inferior a utilizada neste experimento. O ponto de corte utilizado para classificar uma cepa fortemente, moderadamente, fracamente e não formadora de biofilme foi obtido a partir da média da densidade ótica de três valores superior a 0,325, do intervalo de 0,162 - 0,325, 0,081 – 0,162 e menor que 0,081, respectivamente. A partir destes valores, as cepas utilizadas neste experimento foram classificadas nas diferentes categorias, como pode ser observado na Tabela 1.

PUFFAL (2013) testaram 47 cepas de *Salmonella Enteritidis*, 89,4% foram capazes de formar biofilme em placas de poliestireno. Dentre estas, 42,4% foram consideradas fracas produtoras, 14,9% produtoras moderadas e 34% fortes produtoras. A diferença encontrada pode estar associada à subjetividade dos ensaios fenotípicos, tendo em vista que a produção *in vitro* de biofilme pode ser influenciada por diferentes condições de crescimento e mecanismos de aderência (OLIVEIRA et al., 2006).

A capacidade de produzir biofilme é um fator preocupante, pois o biofilme ajuda a bactéria a sobreviver em ambientes hostis dentro do hospedeiro, e esse é um fator responsável por infecções crônicas e/ou persistentes (COSTERTON et al., 1999). Além da resistência a antimicrobianos (TABAQ et al., 2007), o biofilme protege as bactérias de estresses ambientais, tais como a ação de desinfetantes, favorecendo a colonização e a persistência desses micro-organismos no ambiente industrial (JOSEPH et al., 2001) e desta forma, por ser uma fonte de contaminação microbiana aos alimentos, podendo transmitir doenças, além de aumentar a resistência à limpeza e sanitização.

**Tabela 1:** Cepas de *Salmonella* spp. formadoras de biofilme.

Cepas Bacterianas	Média da Densidade Ótica do Ensaio de Biofilme (A <sub>570</sub> )	Categorias Analisadas*			
		1	2	3	4
1	0,154			X	
2	0,447	X			
3	0,303		X		
4	0,210		X		
5	0,283		X		
6	0,262		X		
7	1,532	X			
8	0,539	X			
9	0,516	X			
10	0,679	X			
11	0,193		X		

\*Categorias 1: Cepas fortemente formadoras de biofilme; 2: moderadamente formadoras, 3: fracamente formadoras e 4: não formadoras.

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que todas as cepas de *Salmonella* analisadas apresentaram a capacidade de formar biofilme. Estes resultados induzem a uma preocupação a respeito destes patógenos poderem aderir e permanecer em diferentes ambientes de processamento e desta forma, aumentando as chances de contaminação dos alimentos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M.R.I. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, n.2, p.141-147, 2004.
- CDC, Estimates of foodborne illness in the United States, 2011, Disponível em: [www.cdc.gov/foodborneburden](http://www.cdc.gov/foodborneburden).
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, v.284, p. 1318-1322, 1999.

- DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; COELHO, F.J.O.; TEJADA, T.S.; SEGATTO, M.; TIMM, C.D. Qualidade higiênico sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescais comercializados no Sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 359-363, 2008.
- FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz. RODRIGUES, D. P.; THEOPHILO, G. N. D.; REIS, E. M. F.; LÁZARO, N. S. **Doenças de transmissão alimentar: aspectos clínicos, coleta e transporte de material**, 2008. Disponível em: <<http://bvs.panalimentos.org/local/file>>.
- GILBERT, P.; MC BAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.51, 4, 245-248, 2003.
- JOSEPH, B., OTTA, S. K., KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, n.3, p.367-372, 2001.
- MARQUES, C. S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.118, p.133-140, 2006.
- RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N.; TAGLIARI, V.Z.; OLIVEIRA, A.P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S.C.; TAGLIETI, R.M.; DICKE, E.L.; NASCIMENTO, V.P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.3, p.225-230, 2009.
- PUFFAL, J. Investigação de genes de resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella* Enteritidis. 2013. 53f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2013.
- STEENACKERS, H.P.L.; ERMOLATEV, D.S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; De COSTER, D.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E.V.; DE VOS, D.E.; VANDERLEYDEN, J.; De KEERSMAECKER, S.C.J. Structure-activity relationship of 2-hydroxy-2-aryl-2,3-dihydroimidazo [1,2-a]pyrimidinium salts and 2N-substituted 4(5)-aryl-2-amino-1H-imidazoles as inhibitors of biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic Medical Chemistry**, v.19, 3462-3473, 2011.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, 175-179, 2000.
- STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, n.5, p.428-432, 2004.
- TABAK, M.; SCHER, K.; HARTOG, E.; RÖMLING, U.; MATTHEWS, K. R.; CHIKINDAS, M. L.; YARON, S. Effect of triclosan on *Salmonella* Typhimurium at different growth stages and in biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v.267, n.2, p.200-206, 2007.
- ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry –Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, n.2, p.125-148, Oct.1994.