

AVALIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO E DO INÓCULO BACTERIANO NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME UTILIZANDO ISOLADOS DE *Salmonella* spp.

SOÉLEN SCHMECHEL WOLTER¹; THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES²;
CLÁUDIO DIAS TIMM³; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – soelenw96@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mirismoraes@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Um biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebida em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos e exibe um fenótipo alterado quanto ao seu crescimento, expressão gênica e produção de proteínas (DONLAN & CONTESTON, 2002). Microrganismos em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando uma fonte de contaminação de alimentos (CHAVANT et al., 2007).

Várias bactérias formam biofilme e dentre estas bactérias formadoras de biofilme e de importância para a saúde pública destacam-se os patógenos do gênero *Salmonella* spp. *Salmonella* possui a capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies. O processo de formação de biofilme depende de vários fatores, como interação entre as células bacterianas (presença de fimbrias, flagelos), da superfície de adesão e as condições do ambiente onde a bactéria se encontra (temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, etc.), favorecendo desta forma a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis (CAPPITELLI et al, 2014, WHITEHEAD & VERRAN, 2015, BORGES et al., 2018). Baseado no exposto, este estudo teve por objetivo avaliar a influência do meio de cultura e da concentração do inóculo na formação de biofilme, utilizando isolados de *Salmonella* spp. obtidos de embutidos frescos.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em estabelecimentos comerciais da região de Pelotas, Rio Grande do Sul, no qual foram analisadas 11 amostras de lingüiça suína do tipo fresco de duas marcas diferentes. Estas amostras ao serem adquiridas foram armazenadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e mantidas sob refrigeração até serem analisadas.

2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003), que regulamenta os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Os resultados foram interpretados e comparados de acordo com os parâmetros

estabelecidos pela Instrução Normativa nº60 (BRASIL, 2019) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.3 Preparo do Inóculo

Inicialmente, os isolados de *Salmonella* foram inoculados em caldo Trypticase de Soja (TSB, Merck) e incubados a 37°C/24 horas. Após, a densidade ótica de cada cultivo foi padronizada (A600nm) para 1,0.

2.4 Condições Experimentais do Ensaio de Biofilme

Os isolados obtidos das amostras analisadas foram semeados em caldo Trypticase de Soja (TSB, Merck), sendo utilizado o meio puro (TSB) e diluído (TSB 1:10) e diferentes diluições do inóculo (1:10, 1:20 e 1:100). Cada isolado obtido das amostras analisadas foi submetido a estas condições experimentais. No experimento foi utilizado uma cepa de referência de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311) e esta foi submetida às mesmas condições experimentais que os isolados.

2. 5 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 em torno de 200 µL de caldo TSB (puro e diluído 1:10) em cada poço de uma placa de 96 cavidades estéril (Nunc, ThermoScientific, Denmark) adicionados de 2 (1:100), 10 (1:20) e 20 (1:10) µL de culturas *overnight* em BHI de cada isolado e da cepa de referência, com a densidade ótica padronizada em um espectrofotômetro a 600 nm em um intervalo de 0,9-1,0. Poços com 200 µL de caldo TSB (puro e diluído) sem cultura bacteriana foram utilizados como controle negativo. Então, a tampa foi colocada sobre a placa e estas foram incubadas durante 48 h a 37°C sem agitação. Após, as tampas das placas (Nunc-TSP, ThermoScientific, Denmark) foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS – Phosphate Buffered Saline) 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 ensaio foi realizado em triplicata utilizando três cultivos diferentes de *Salmonella* e cada cultivo foi inoculado em seis cavidades da placa de cada condição experimental realizada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 11 amostras analisadas de embutidos frescos, três (27,3%) foram positivas para a presença de *Salmonella* spp., estando em desacordo com a legislação vigente (BRASIL, 2019) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que define ausência de *Salmonella* para essa categoria de produto em 25g. Um estudo semelhante realizado por Valiatti e colaboradores (2016), verificaram que 20% das 30 amostras de linguças do tipo frescal de seis estabelecimentos diferentes no município de Ji-Paraná em Rondônia analisadas estavam contaminadas com *Salmonella* e desta forma, encontravam-se fora dos padrões exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2019).

A padronização do ensaio de biofilme foi realizada com três isolados de *Salmonella*, obtidos das amostras analisadas e com uma cepa ATCC de

Salmonella Typhimurium. A cepa de referência não formou biofilme, independente da concentração de inóculo utilizada (1:10, 1:20 e 1:100) e do meio utilizado (TSB puro e diluído). Em relação aos isolados de *Salmonella* (213, 215 e 216), os três (100%) formaram biofilme quando o meio de cultivo utilizado foi o caldo TSB diluído 1:10. Os isolados 213 e 216 formaram biofilme quando o meio inoculado foi o TSB puro. O isolado 215 não formou biofilme com o meio puro. Como já mencionado, a formação de biofilme é dependente de vários fatores. Baseado na literatura, a composição do meio é o fator que mais influencia na habilidade da bactéria em produzir biofilme *in vitro* (DEIGHTON et al., 2001, MACK et al., 2001, STEPANOVIC et al., 2003). O meio diluído foi utilizado neste experimento com o objetivo de verificar se uma menor disponibilidade de nutrientes seria capaz de induzir a bactéria a formar biofilme e isto foi observado no estudo realizado, ou seja, frente a menor concentração de nutrientes presente no meio diluído, *Salmonella* formou biofilme.

Em relação ao inóculo pesquisado, não foi possível observar diferença na concentração dos inóculos utilizados (1:10, 1:20 e 1:100) em relação à formação de biofilme, pois independente da concentração utilizada, houve a formação de biofilme, sendo isto observado nos isolados inoculados no caldo TSB diluído (213, 215 e 216) e no TSB puro (213 e 216). Isto pode ter ocorrido em decorrência do tempo de incubação prolongado utilizado, ou seja, de 48 horas de incubação. O tempo de incubação das placas é importante, desde que a densidade do biofilme é dependente do tempo de incubação. A metodologia referenciada neste trabalho recomenda um tempo de incubação de 24 horas (STEENACKERS et al., 2011). No entanto, neste trabalho foi analisado o período de incubação de 48 horas para aumentar a chance de formar biofilme e em decorrência disto não foi possível observar diferença entre os inóculos testados (2, 10 e 20 µL). Baseado neste fato, outros estudos ainda serão realizados com um tempo de incubação menor, no intuito de verificar se há diferença entre as concentrações de inóculo utilizadas.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *Salmonella* obtidos de embutidos frescos mostraram ser formadores de biofilme no meio puro e diluído utilizados, independente da concentração de inóculo utilizada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA, S.N.; MENEZES, R.; TONDO, E.C.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.38, p.71-76, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União. Brasília, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019. **Dispõe sobre as listas de padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília - DF, 2019.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal Microbiology Methods**. n.68, v.3, p.605-12, 2007.

CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F. 2014. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. **Food Engineering Reviews**, n.6, p.29-42, 2014.

DEIGHTON, M.A.; CAPSTICK, J.; DOMALEWSKI, E.; van NGUYEN, T. Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. **Methods in Enzymology**, v.336, p.177-195, 2001.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, n.15, p.167-193, 2002.

MACK, D.; BARTSCHT, K.; FISCHER, C.; ROHDE, H.; de GRAHL, C.; DOBISNSKY, S.; HORSTKOTTE, M.A.; KIEL, K.; KNOBLOCH, J.K. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. **Methods in Enzymology**, v.336, p.215–239, 2001.

STEENACKERS, H.P.L.; ERMOLATEV, D.S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; COSTER, D.De.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E. V.; VOS, D.E.De.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C.J De. Structure–activityrelationship 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 Medicinal Chemistry**, p.3462-3473, 2011.

STEPANOVIC, S.; DAKIC, I.; OPAVSKI, N.; JEZEK, P.; RANIN, L. Influence of the growth medium composition on biofilm formation by *Staphylococcus sciuri*. **Annals Microbiology**, Paris, v.53, p.63–74, january, 2003.

VALIATTI, T. B.; CALEGARI, G. M.; SOBRAL, F. de O. S.; ROMÃO, N. F.; GASPAROTTO, P. H. G. Avaliação microbiológica de linguças tipo frescal comercializadas em supermercados do município de Ji - Paraná, Rondônia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 678-686, 2016.

WHITEHEAD, K.A. & VERRAN, J. 2015. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, n.2, p.84-91, 2015.