

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Salmonella* ENTERITIDIS  
SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E O EFEITO DE TRATAMENTOS DE  
REMOÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Bruna Webber**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2015**

**DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Salmonella* ENTERITIDIS  
SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E O EFEITO DE TRATAMENTOS DE  
REMOÇÃO**

Bruna Webber

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação** – Área de concentração em Higiene, inspeção, microbiologia e composição química de alimentos.

**Orientadora: Profa. Laura Beatriz Rodrigues**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2015**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Salmonella* ENTERITIDIS  
SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E O EFEITO DE TRATAMENTOS DE  
REMOÇÃO**

Elaborada por  
**Bruna Webber**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioexperimentação**

**Comissão Examinadora**

**Laura Beatriz Rodrigues, Doutora, UPF  
(Orientadora/Presidente)**

**Luciana Ruschel dos Santos, Doutora, UPF**

**Benito Guimarães de Brito, Doutor, IPVDF**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2015**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença insubstituível em cada instante de minha vida.

Aos meus pais, Jane e Celso, por todo o apoio e carinho, e aos quais devo todas as minhas conquistas.

Ao meu irmão Mateus, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado Felipe, por ser o maior incentivador nessa escolha e pelo carinho e amor.

À Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade de realização desse curso e pelo aprendizado.

À Professora Laura Beatriz Rodrigues, amada orientadora, por acreditar na minha capacidade, estar sempre disposta a ajudar, pela dedicação, orientação e eterno exemplo profissional e pessoal. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À Professora Luciana Ruschel dos Santos, pela ajuda valiosa e ensinamentos.

À Professora Luciane Daroit, pelo empenho e dedicação em realizar a análise estatística do projeto, sem você não seria possível.

A todos os professores Doutores que compõe o seletivo grupo de docentes do programa PPG-Bioexperimentação.

A todos os funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário, especialmente Natalie, Lisangela e Alana.

Às colegas de mestrado: Isabel, Daniela, Elis e Sabrina pela amizade e ajuda.

À colega de mestrado Marta pela amizade e companhia de tantas idas a Passo Fundo.

Aos colegas de laboratório e mestrados: Emanuele, Amauri, Sara, Raíssa, Nyelle, Eduarda e Juliana. Pela ajuda, amizade e apoio.

Aos bolsistas de iniciação científica do GEMicro, pela constante ajuda na realização deste trabalho, sem vocês nada disso seria possível.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração do projeto.

À FAPERGS pelo apoio financeiro.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha orientadora e à minha família, pelo apoio, incentivo e carinho. À vocês, minha eterna gratidão.

## **EPÍGRAFE**

“Ele não sabia que era impossível. Foi lá e fez.”

Jean Cocteau

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 O GÊNERO <i>Salmonella</i> spp.....	16
2.1.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	18
2.2 BIOFILMES MICROBIANOS.....	19
2.2.1 Controle <i>in vitro</i> na formação de biofilmes.....	23
2.2.2 Controle químico e biológico na formação de biofilmes.....	24
2.3 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	25
<b>3. CAPÍTULO 1. The Use of Vortex and Ultrasound Techniques for the <i>in vitro</i> Removal of <i>Salmonella</i> spp. Biofilms</b> .....	30
Abstract.....	31
Introduction.....	32
Material and methods.....	33
Results.....	36
Discussion.....	36
Conclusion.....	38
Sources and manufactures.....	38
References.....	39
<b>4. CAPÍTULO 2. Dinâmica de formação de biofilmes por <i>Salmonella</i> Enteritidis sob diferentes temperaturas e o efeito de tratamentos de remoção</b> .....	44
Resumo.....	45
Introdução.....	45
Materiais e métodos.....	47
Resultados.....	50
Discussão.....	57
Referências.....	65
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	73
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	74
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	75

## LISTA DE FIGURAS

### 3. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1. Stainless steel surface with biofilm formation by *S. Enteritidis* ATCC 13076 42

### 4. CAPÍTULO 2

- FIGURA 1. Formação de Biofilme de *S. Enteritidis* de origem avícola, sob diferentes temperaturas de incubação. 52
- FIGURA 2. Formação de biofilme pela *S. Enteritidis* 106 em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas e procedimentos de higienização. 53
- FIGURA 3. Formação de biofilme pela *S. Enteritidis* 84 em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas e procedimentos de higienização. 54
- FIGURA 4. Formação de Biofilme de *S. Enteritidis* de origem avícola, sob diferentes superfícies usadas na indústria de alimentos. 55
- FIGURA 5. Remoção de Biofilme de *S. Enteritidis* de origem avícola, em aço inoxidável, polietileno e poliuretano, por diferentes procedimentos de higienização. 56

## LISTA DE TABELAS

### 3. CAPÍTULO 1

TABELA 1.	Vortexing and ultrasound methods in removing biofilms <i>in vitro</i> formed by <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Enteritidis and <i>Salmonella</i> Enteritidis P106.	42
-----------	--	----

### 4. CAPÍTULO 2

TABELA 1.	Formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> . Médias das repetições.	51
TABELA 2.	Formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> sob diferentes temperaturas de incubação. Médias das repetições, em todas as superfícies testadas.	51
TABELA 3.	Formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> em polietileno, poliuretano e aço inoxidável. Médias das repetições, sob todas as temperaturas de incubação.	55
TABELA 4.	Quantificação da remoção de biofilmes por duas cepas de <i>S. Enteritidis</i> de origem avícola, por diferentes procedimentos de higienização. Médias das repetições.	57

**LISTA DE ABREVIATURAS**

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Tipos de Cultura
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> – Infusão Cérebro-coração
TSB	Caldo triptona de Soja
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Substância polimérica extracelular
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
mL	Mililitro
kHz	Quilohertz
W	Watts
UFC	Unidade formadora de colônia
UE	União Européia
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
WHO	World Health Organization – Organização mundial da saúde
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
XLD	Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato
µL	Micro litro
PRP	Programa de redução de patógenos

## RESUMO

**Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação  
Universidade de Passo Fundo**

**Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis sob diferentes temperaturas e o efeito de tratamentos de remoção**

Autor: Bruna Webber

Orientadora: Laura Beatriz Rodrigues

Passo Fundo, 31 de julho de 2015

A *Salmonella* Enteritidis 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 inertes de processamento de alimentos que, uma vez formados, agem como pontos de contaminação constante. 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. Com base na relevância destes temas, esta dissertação foi elaborada com dois artigos científicos. No Capítulo 1 foram comparados dois métodos laboratoriais para remover biofilmes de *Salmonella* spp., cultivadas *in vitro* em superfície de aço inoxidável proveniente de indústria de alimentos. Utilizaram-se, na etapa de remoção, o turbilhonamento com vórtex por 2 min, e o método de sonicação por 10 min (banho de ultrassom, com frequência de 40 kHz e potência de 81 W). Apesar de não encontrarmos diferença estatística entre os métodos, o uso do ultrassom foi escolhido como padrão para a desadesão devido à facilidade de uso e às propriedades hidrodinâmicas que desestabilizam a estrutura do biofilme. No Capítulo 2 avaliou-se a capacidade da SE formar biofilme em diferentes superfícies e processos de higienização. Nos procedimentos de higienização os cupons permaneceram por 3 minutos imersos 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. A aderência bacteriana indicou que ambas as SE aderiram ao polietileno, poliuretano e no aço inoxidável. Entre as temperaturas de exposição, a SE 84 e a SE 106 aderiram sob todas as temperaturas de exposição, 3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C, aumentando a adesão conforme subia a temperatura, mas sem diferença estatística. O ácido peracético e a água a 85°C tiveram ação semelhante na remoção do biofilme. Já a água a 45°C não foi eficaz, ficando próximo do controle. O outro sanitizante testado, a amônia quaternária, removeu o biofilme, mas com menor eficácia comparado ao ácido peracético. De maneira geral, os resultados demonstraram que esses materiais, utilizados na indústria de alimentos, propiciaram a aderência das SE nas diferentes condições ambientais. Enfatiza-se a formação de biofilmes em temperaturas de refrigeração, principalmente a 3°C, até então não descrita como possível para crescimento de *Salmonella* spp. nestas superfícies. Nossos resultados são, portanto, importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle de biofilmes de *Salmonella* e pode auxiliar a

indústria avícola a ter um maior conhecimento das reais condições dos abatedouros, levando a um aprimoramento das condições higiênicas destes estabelecimentos.

**Palavras-chave:** *Salmonella* Enteritidis, biofilmes, temperaturas de incubação, superfícies, métodos de remoção.

## ABSTRACT

**Master's Dissertation**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação**  
**Universidade de Passo Fundo**

### **Dynamics of biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis under different temperatures and the effect removal treatments**

Author: Bruna Webber

Advisor: Laura Beatriz Rodrigues

Passo Fundo, 31 de julho de 2015

*Salmonella* Enteritidis is the most common serotype in humans worldwide, being the main cause of foodborne illness outbreaks. *Salmonella* spp. can adhere and form biofilms on inert surfaces of food processing, and once formed, they act as constant contamination points. Sessile microorganisms resist significantly more to agents used in cleaning procedures, consisting in the use of hot water, detergent and sanitizing, aiming to reduce microorganisms to safe levels, so as to obtain a product of good sanitary conditions. On the basis of relevance of these themes, this dissertation was drawn up on two scientific papers. In Chapter 1, we compared two laboratory methods to remove biofilms *Salmonella* spp., grown *in vitro* on stainless steel surface from the food industry. Were used, in the removal stage, the vortexing performed for 2 min, and sonication method, with coupons maintained for 10 min in ultrasound bath, at a frequency of 40 kHz and potency 81 W. Although there was no statistical difference between the tested methods, the use of ultrasound, will be used for the standard detachment, due to their ease of use and hydrodynamic properties that destabilize the structure of the biofilm. In Chapter 2, we evaluated the SE's ability to form biofilms on different surfaces and cleaning processes. Stainless steel coupons, polyethylene and polyurethane were immersed with bacterial culture of each strain SE 84 and SE 106, both coming from the poultry environment. Was incubated at 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C and 3±1°C, at 0, 4, 8, 12 and 24 hours. In the hygiene procedures, coupons immersed for 3 minutes in sterile heated water to 45°C and 85°C, and peracetic acid 0,5% solutions and quaternary ammonium 1%, for 5 minutes. The bacterial adherence indicated that both SE adhered to the polyethylene, polyurethane and stainless steel. Among the exposure temperatures, SE 84 and SE 106 adhered to all exposure temperatures 3°C, 9°C, 25°C, 36°C and 42°C, increasing the adherence as the temperature rise, but with no statistical difference. The peracetic acid and water at 85°C were similar action in biofilm removal. Since the water at 45°C was not effective, getting close to the control. Other sanitizer tested, quaternary ammonia, removed the biofilm, but with lower efficacy compared to peracetic acid. Overall, the results demonstrated that these materials used in the food industry, propitiated the adherence of SE serovars in different environmental conditions. Emphasizes the biofilms formation in refrigeration temperatures, especially at 3°C, not previously described possible for growth of *Salmonella* spp. on these surfaces. Our results are, therefore, important for development *Salmonella* biofilm control strategies and may assist the poultry industry to have a greater knowledge of the actual conditions of slaughterhouses, leading to an improvement of hygienic conditions these establishments.

**Key words:** *Salmonella* Enteritidis, biofilms, incubation temperatures, surfaces, removal methods.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF)<sup>1</sup> no relatório anual de 2013, a produção de carne de frango chegou a 12,645 milhões de toneladas em 2012, em uma redução de 3,17% em relação a 2011. Em 2013, esse valor foi de 12,30 milhões de toneladas. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno e 31% para exportações.

A avicultura, no Brasil, é responsável por empregar mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. A importância social da avicultura se verifica também pela presença de indústrias no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste, sendo em muitas cidades a produção de frangos a principal atividade econômica<sup>1</sup>. O Rio Grande do Sul é o terceiro maior estado exportador de carne de frango do Brasil, representando o montante de 711.318 toneladas, ficando atrás somente dos estados do Paraná e de Santa Catarina<sup>2</sup>.

A indústria avícola brasileira tem um bom desempenho devido a sistemas de tecnologia avançados, permitindo à população adquirir um produto de boa qualidade a baixos custos<sup>3</sup>. Aliado a isso se tem a necessidade de manutenção da sanidade dos plantéis avícolas e, também, das condições higiênico-sanitárias dentro dos abatedouros.

A presença de microrganismos patogênicos, como a *Salmonella* spp., afeta negativamente a indústria avícola. No Rio Grande do Sul, de 1980 a 2012, foram notificados 4.071 surtos de DTA, abrangendo 358.161 pessoas expostas ao risco de adoecer e internar por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa. A *Salmonella* spp. foi responsável por aproximadamente 60% dos surtos investigados<sup>4</sup>. No Brasil, segundo os dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde, foram reportados 2834 surtos de DTAs entre 1999 a 2007, e 42% foram causados pelos diferentes sorovares de *Salmonella* spp e muitos casos estavam relacionados com o consumo de carne de aves ou ovos<sup>5</sup>.

A *Salmonella* Enteritidis (SE) é um dos sorovares de maior distribuição no mundo. Segundo dados da WHO, até o ano de 2012 a SE está entre os 15 sorovares mais sorotipificados de amostras de seres humanos, alimentação humana, de animais, meio ambiente e na alimentação animal<sup>6</sup>. A *S. Enteritidis* foi identificada como causadora da maioria das salmoneloses alimentares investigadas pela Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul nos últimos anos<sup>4</sup>. Devido a isso, se torna essencial o seu controle em

abatedouros avícolas, por possuir relevância como causadora de doenças veiculadas por alimentos e, conseqüentemente, além das preocupações de saúde pública, terem reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações.

Outra grande preocupação em relação às condições higiênico-sanitárias dos abatedouros avícolas é a formação de biofilmes, que são microrganismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, e uma vez constituídos, agem como pontos de contaminação constante, liberando fragmentos ou células planctônicas dos microrganismos, como *Salmonella* spp, podendo comprometer a qualidade microbiológica de produtos<sup>7</sup>.

A *Salmonella* spp. adere e forma biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno e poliuretano. Microrganismos em seu estilo de vida sésil resistem significativamente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização, como os sanitizantes usados na etapa de higiene pré-operacional realizada nos abatedouros, o biofilme atua como uma barreira física que impede ação de agentes sanitizantes, tornando a eliminação desses patógenos de instalações de processamento de alimentos um grande desafio<sup>8</sup>.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram, comparar métodos de remoção de biofilmes *in vitro*, e avaliar a dinâmica de formação de biofilmes mono-espécie de 2 amostras de *Salmonella* Enteritidis, oriundas de aves e do ambiente de criação avícola, avaliando a eficácia dos procedimentos de higiene operacional e pré-operacional mimetizados em diferentes superfícies. Verificando a habilidade de *Salmonella* Enteritidis formar biofilme mono-espécie em aço inoxidável, polietileno e poliuretano, a  $42\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $36\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $9\pm 1^\circ\text{C}$  e  $3\pm 1^\circ\text{C}$ , nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas, utilizando microbiologia convencional. Além de verificar a sensibilidade destes biofilmes frente aos tratamentos com água quente a  $45^\circ\text{C}$ , água quente a  $85^\circ\text{C}$ , ácido peracético e amônia quaternária.

A presente dissertação é composta por esta introdução, uma breve revisão de literatura sobre o gênero *Salmonella* spp, *Salmonella* Enteritidis, biofilmes microbianos, controle *in vitro* na formação de biofilmes, controle químico e biológico na formação de biofilmes, higienização na indústria de alimentos, e, ainda, por dois artigos científicos. O Capítulo 1, **“The Use of Vortex and Ultrasound Techniques for the *in vitro* Removal of *Salmonella* spp. Biofilms”** teve como objetivo avaliar a eficácia desses dois métodos laboratoriais para remover biofilmes de *Salmonella* spp., cultivadas *in vitro*, em superfície de aço inoxidável proveniente de indústria de alimentos e foi submetido para a revista Acta Scientiae Veterinariae. O Capítulo 2 **“Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella***

**Enteritidis sob diferentes temperaturas e o efeito de tratamentos de remoção”** teve como objetivo avaliar a capacidade da *Salmonella* Enteritidis em aderir e formar biofilme, em diferentes superfícies comumente usadas na indústria de alimentos, sob diferentes temperaturas e tempos, assim como a resistência a sanitizantes e processos de higienização e será submetido posteriormente para a revista Biofouling.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O GÊNERO *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é pertencente à família Enterobacteriaceae, essa família possui mais de 25 gêneros bacterianos, incluindo um grande número de patógenos, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. entre outros. Estudos genéticos estimam que os genomas de *E. coli* e de *Salmonella enterica* possuam uma diferença de apenas 10% nas suas sequências de DNA, sugerindo que estas espécies tenham derivado de um ancestral comum, há 100 milhões de anos<sup>9</sup>.

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente em todo o mundo e foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885, por Daniel Elmer Salmon. A *Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de endosporos e com formato de bastonetes curtos. A maioria das espécies são móveis (com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), com flagelos peritríquios. Fermenta a glicose produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. Possuem como temperatura ótima de crescimento aproximadamente 38°C e a temperatura mínima em torno de 5°C. São relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C por 15 a 20 minutos<sup>10</sup>.

Sua classificação reconhecida atualmente inclui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta com seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*. No ano 2007, o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL) para caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas. Os sorovares devem ser escritos com a primeira letra maiúscula, ou seja, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, denominada comumente *S. Enteritidis*<sup>10,11</sup>.

Considerada uma bactéria cosmopolita, com distribuição em praticamente todos os países<sup>12</sup>, causa a salmonelose, uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças alimentares, constituindo uma grande responsabilidade em saúde pública e representando um custo significativo em muitos países. O número exato de casos clínicos não é conhecido devido à subnotificação, mas milhões de casos em seres humanos são mundialmente relatados todos os anos e a doença resulta em milhares de mortes<sup>13,14,15</sup>. A salmonelose é uma das

zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, com padrões diferenciados de acordo com diversos fatores numa região como diferenças nos hábitos alimentares, práticas de manipulação de alimentos, criação de animais, padrões de higiene e saneamento básico<sup>16</sup>.

Conforme dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention* - CDC), 48 milhões de pessoas ficam doentes e outras 3.000 morrem por ano em decorrência das doenças transmitidas por alimentos apenas nos Estados Unidos<sup>17,18</sup>. Deste total, acredita-se que 1,2 milhões dos casos sejam causados por *Salmonella* spp.<sup>19</sup>.

No Brasil, *Salmonella* spp. foi responsável por 42,27% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos, sendo considerada o principal agente responsável<sup>20</sup>. No RS, de 1980 a 2012, foram notificados 4.071 surtos de DTA, abrangendo 358.161 pessoas expostas ao risco de adoecer e internar por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa, com 49.451 doentes e 11 óbitos. A *Salmonella* spp. foi responsável por aproximadamente 60% dos surtos investigados<sup>4</sup>. Este número alto de casos registrados no RS pode ser devido a maior notificação e investigação dos surtos no estado, quando comparado a outras regiões do país.

O controle das salmoneloses representa um desafio para a saúde pública, considerando o surgimento de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados, sendo assim os esforços para o controle da *Salmonella* são muitas vezes dificultados pela diversidade de sorovares existentes.

Existem evidências que os produtos da carne de frango são uma das mais importantes fontes de infecção para este organismo<sup>21,22</sup>. Frente a isso, em 1995, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com a Instrução Normativa nº 78, reforçou a legislação de controle de sorotipos de *Salmonella* spp. nas granjas avícolas, enfatizando o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), contemplando que toda granja de reprodutoras de aves deve ser sorológica e bacteriologicamente monitorada para detecção de *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*<sup>23</sup>.

Aliado a isso, em 2003 foi emitida a Instrução Normativa nº 70 com o Programa de Redução de Patógenos, visando conferir um controle sobre o processo de abate em carcaças de frango para pesquisa de *Salmonella* spp, envolvendo todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com isso atendendo as exigências de segurança do alimento no mercado interno e externo<sup>24</sup>. A aplicação desses critérios para

patógenos alimentares como *Salmonella* em pontos específicos da cadeia alimentar é de grande importância para se melhorar a segurança alimentar.

### 2.1.1 *Salmonella* Enteritidis

A *Salmonella* Enteritidis (SE) é um dos sorovares de maior distribuição no mundo. Segundo dados da WHO, em seu programa Global Salm-Surv (GSS), até o ano de 2012 a SE está entre os 15 sorovares mais sorotipificados de amostras de animais, meio ambiente e na alimentação animal. Entretanto, a SE não está nas primeiras posições do ranking nestas amostras. Em contrapartida, é o sorovar mais detectado em seres humanos e o segundo mais prevalente em alimentos para alimentação humana. Resultados semelhantes são reportados em outros países, o que torna a pesquisa de SE essencial por ser um dos mais incidentes em infecções alimentares no mundo<sup>13</sup>.

Recentemente a SE se tornou o sorotipo mais comum nos seres humanos em âmbito mundial, especialmente na Europa, onde responde por 85% dos casos, seguido da *Salmonella* Typhimurium que está em segundo lugar<sup>25</sup>. Sua presença generalizada poderia ser explicada pela intensificação e globalização do tráfego no comércio global.

Segundo Robinsom<sup>26</sup>, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Javiana* e *S. Heidelberg* são os cinco sorovares mais comumente encontrados em caso de surtos de salmonelose em todo o mundo, sem considerar a fonte de contaminação. Conforme dados do CDC, os sorovares mais encontrados em aves nos Estados Unidos são *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Senftenberg*<sup>27</sup>. Já no Brasil, os principais sorovares encontrados em carcaças de frango e aves vivas, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Mbandaka*<sup>28</sup>.

A *S. Enteritidis* foi identificada como causadora da maioria das salmoneloses alimentares investigadas pela Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul nos últimos anos<sup>4</sup> e, dentre as fontes de contaminação de SE, as carnes e produtos à base de ovos são as mais importantes, sendo a carne de frango o veículo em numerosos casos de infecções humanas, gerando no homem quadros de salmonelose<sup>29</sup>.

Na salmonelose, após a ingestão oral, as bactérias que sobrevivem ao baixo pH provocado pelo ácido clorídrico colonizam o intestino, principalmente na região das placas de Peyer, onde estão localizadas as células M. Depois da colonização intestinal, a *Salmonella*

spp. invade as células M e os enterócitos, com auxílio do Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT)<sup>30</sup>. Após a invasão celular, as células bacterianas são fagocitadas por macrófagos. Quando os mesmos conseguem deter a bactéria, ela causa apenas a infecção local no trato digestivo. Por outro lado, quando as bactérias conseguem permanecer viáveis dentro dos macrófagos, ocorre a infecção sistêmica. Dentro dos macrófagos, a *Salmonella* spp. consegue se multiplicar e é levada à todo o organismo<sup>31</sup>.

A salmonelose pode causar infecções focais, febre entérica, septicemia e o mais comum a enterocolite. Uma pessoa infectada apresenta sinais clínicos como febre, cólicas abdominais e diarreia a partir de 12 a 72 horas após o consumo do alimento ou bebida contaminada, sendo que a doença pode durar de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas se recuperam sem o uso de antibióticos. Entretanto, a severidade da doença depende do sorovar e da imunidade do hospedeiro, os quadros podem ser severos em pessoas imunologicamente debilitadas, necessitando de hospitalização<sup>17</sup>.

Alem disso a *S. Enteritidis* tem a capacidade de formar biofilme em diferentes materiais e sob diferentes condições de crescimento, entre essas diferentes temperaturas, vários estudos mostraram diferenças significativas entre sorovares, indicando que a capacidade de formação de biofilmes é importante para a sobrevivência da bactéria em ambientes de processamento de alimentos<sup>32</sup>. Esse microrganismo têm numerosos fatores de virulência como: adesinas, toxinas, além de possuir um plasmídeo de virulência que permite que a bactéria persista no interior das células retículo-endoteliais<sup>25</sup>. Produzem também fímbrias que facilitam a adesão a superfícies e que fornece resistência contra forças mecânicas mantendo-se nas superfícies<sup>32</sup>.

Considerada um dos enteropatógenos humanos mais frequentemente associados ao trato digestório das aves, e originando-se de diferentes fontes do ambiente avícola<sup>33</sup>, se torna essencial o seu controle em abatedouros avícolas, por possuir relevância como causadora de doenças veiculadas por alimentos e, conseqüentemente, além das preocupações de saúde pública, terem reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações.

## 2.2 BIOFILMES MICROBIANOS

A microbiologia tradicional estudou, desde seu início, a caracterização das células encontradas em suspensões, denominadas como planctônicas, ou seja, de vida livre. Contudo, as primeiras observações de células aderidas foram realizadas já por Antonie van Leeuwenhoek que, estudando amostras de dente no século XVII, em seu microscópio

rudimentar, visualizou mais fragmentos de células agregadas (sésseis) do que planctônicas. A capacidade das bactérias de formar comunidades complexas e viver em agregados foi estudada desde os tempos de Robert Koch no século XIX<sup>34</sup>.

A primeira publicação que descreve células aderidas foi descrita por Zobell em 1943, onde iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios e em diferentes tipos de superfícies, que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas<sup>35</sup>.

Em 1978, técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas foram empregadas por Costerton, o qual verificou que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava fixo a suportes, e não na forma livre, e que atribuiu o nome de biofilme às células microbianas aderidas<sup>36</sup>.

Biofilmes são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), aderidas a um substrato biótico ou abiótico, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética<sup>37</sup>.

Os biofilmes podem estar aderidos a qualquer superfície. São envolvidos por uma matriz de polímeros orgânicos, local onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálice e, atualmente, conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS)<sup>38</sup>. A adesão superficial dos microrganismos forma o EPS, que sobrevive a ambientes hostis, de modo a bloquear e reter os nutrientes necessários para o crescimento dos biofilmes, além de oferecer proteção às células planctônicas contra agentes antimicrobianos<sup>39</sup>.

Os EPS sintetizados por células microbianas variam muito na sua composição e conseqüentemente nas propriedades químicas e físicas. Os polissacarídeos são cadeias moleculares longas e finas que podem estar associados de diferentes formas. O EPS presente nos biofilmes assemelha-se aos polímeros sintetizados pelas correspondentes células em suspensão e sua quantidade sintetizada nos biofilmes dependera da disponibilidade de substratos de carbono e do balanço entre carbono e outros nutrientes limitantes<sup>40</sup>. De acordo com alguns autores esta matriz tem inúmeras funções como adesão inicial, retenção de água, adsorção de compostos, fonte de nutrientes, troca e armazenamento de informações genéticas e a principal que é barreira protetora capaz de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos e agentes sanitizantes restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes<sup>41,42</sup>.

A composição dos biofilmes depende de vários fatores: do tipo de microrganismo, do seu estado fisiológico, ambiente físico e da superfície na qual as células estão aderidas. As várias fases da interação microbiana parecem requerer a produção de estruturas extracelulares que ajudam na adesão inicial, na manutenção da estrutura do biofilme e mesmo no desprendimento de agregados<sup>43</sup>. Os produtos excretados incluem enzimas, proteínas, bacteriocinas, solutos de baixa massa e ácidos nucleicos, liberados devido à lise celular<sup>32</sup>.

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, debaixo das quais os microrganismos continuam a se multiplicar, seja em cultivo puro ou em associação com outros microrganismos. Assim, os microrganismos se tornam mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos, como os utilizados nos procedimentos de higienização<sup>44,45</sup>.

Há várias descrições diferentes de estrutura dos biofilmes. Com o surgimento de novas tecnologias, incluindo a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a microscopia confocal (CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy*), a microscopia de contraste diferencial (DIC- *Differential Interference Contrast*) e outras técnicas, lançou várias idéias sobre a estrutura dos biofilmes. Pelo menos três tipos de estruturas diferentes foram publicadas até o momento: a estrutura tradicional do biofilme (estrutura plana e homogênea); o modelo homogêneo em mosaico (constituída por microcolônias de bactérias unidas por EPS rodeadas por uma fase líquida); e a forma em cogumelo (estrutura de biofilme semelhante a um cogumelo com vários canais através dos quais passa a fase líquida), essa última a mais citada<sup>36,46</sup>.

Segundo Notermans et al.<sup>47</sup>, a formação consiste em três etapas, que seria a fixação das bactérias, seguida pela consolidação nas superfícies e, por último, a colonização e a multiplicação nas superfícies. Outra teoria sugere a formação de biofilmes em cinco etapas: I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico. II) transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência. III) início do processo de adesão bacteriana. IV) crescimento celular, colonização e adesão irreversível e V) biofilme com alta atividade metabólica e liberação de células localizadas na periferia<sup>48</sup>.

Depois do contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras se tornam mais grossas com o tempo, levando a formação das matrizes, e outras substâncias orgânicas, inorgânicas e material particulado podem existir juntamente com microrganismos. A produção de EPS aumenta conforme a adesão das bactérias às superfícies<sup>49</sup>.

Além disso, existe um mecanismo de comunicação celular que envolve a síntese bacteriana e a liberação de moléculas sinalizadoras difusíveis, chamado de *quorum sensing* (QS). Estes sinais podem ser dependentes da densidade celular ou produzidos pelas bactérias em diferentes fases de crescimento, permitindo uma regulação da expressão gênica. O QS é medido pelas moléculas N-acil homoserina-lactonas (AHLs), podendo assim monitorar a sua população de biofilmes em um determinado ambiente<sup>32</sup>.

Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando fragmentos ou células planctônicas dos microrganismos, como *Salmonella* spp, podendo comprometer a qualidade microbiológica de produtos<sup>50</sup>. Na indústria alimentícia, constituem um risco higiênico. Causam perdas econômicas devido às falhas técnicas nos sistemas de águas, na qualidade da higienização, manipulação dos produtos, etc. Na medicina, contribuem para o aumento de riscos de infecção devido ao seu crescimento em implantes, na cavidade oral, em catéteres e outros dispositivos médicos<sup>51</sup>. Hoje, a preocupação é notável com organismos patogênicos que se aderem às superfícies e que, posteriormente, irão causar risco à saúde do consumidor.

A *Salmonella* spp. pode aderir e formar biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno e poliuretano<sup>52</sup>. A celulose é um dos principais componentes do biofilme produzido por *S. Enteritidis*. Representa um fenótipo essencial do ciclo de vida do organismo para uma melhor adaptação da sobrevivência bacteriana no ambiente, e maior probabilidade de colonização em um hospedeiro animal<sup>53</sup>. Além da celulose a *S. Enteritidis* produz Tafi, finas fimbrias agregativas que facilitam a adesão às superfícies inanimadas, e fornece resistência às células contra forças químicas e mecânicas. A síntese de ambos componentes, celulose e Tafi, são reguladas por um sistema complexo, que leva à formação de uma rede altamente hidrofóbica, com células muito compactadas em uma matriz rígida<sup>32</sup>.

A susceptibilidade reduzida aos desinfetantes pelos biofilmes torna a sua eliminação de instalações de processamento de alimentos um grande desafio. Costerton et al. relatam que estas células são de quinhentas a mil vezes mais resistentes que as células planctônicas<sup>36</sup>. A limpeza imprópria e a desinfecção ineficaz de equipamentos são fatores importantes na contaminação dos produtos em uma indústria de alimentos, geram um impacto negativo em várias atividades e representam perdas significativas para indústrias alimentícias.

### 2.2.1 CONTROLE *in vitro* DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Apesar do uso de técnicas de processamento de alimentos e de higienização industrial avançada, o número crescente e a gravidade das doenças de origem alimentar em todo o mundo têm aumentado consideravelmente. Chama a atenção dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos e dos pesquisadores em relação à aprimoração nos estudos sobre biofilmes. Atualmente, a segurança alimentar constitui uma preocupação para os consumidores e para a indústria de alimentos, bem como para órgãos responsáveis pela saúde pública<sup>54</sup>.

Neste contexto, métodos laboratoriais estão sendo utilizados e testados *in vitro* para remoção e posterior quantificação dos biofilmes, entre eles o vortex e o ultrassom<sup>55</sup>. O vortex é uma metodologia muito usada em estudos de biofilmes, e 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<sup>56</sup>.

O ultrassom é capaz de inativar as bactérias quando usado em altas frequências (512kHz e 850kHz). Quando usado em frequência moderada (20kHz e 40kHz) atua desaglomerando agregados bacterianos através de efeitos físicos, químicos e mecânicos resultantes de cavitação acústica. Durante esse processo, bolhas de cavitação irão produzir energia suficiente para enfraquecer mecanicamente bactérias ou células. Isto pode ocorrer por meio de inúmeros processos, como alteração na superfície bacteriana induzida por cavitação; gradiente de pressão, resultante do colapso das bolhas de gás que colidem com a superfície do biofilme; força de cisalhamento dentro do biofilme; e ataque químico devido à formação de radicais, como H e OH<sup>-</sup>, durante a cavitação, enfraquecendo o biofilme<sup>57</sup>.

As propriedades hidrodinâmicas do ultrassom desestabilizam a estrutura do biofilme em uma frequência de 26kHz e, quanto maior a intensidade e o tempo de exposição, maior é a quebra do biofilme. Assim esse processo é responsável pela limpeza da superfície que, em alguns casos, mostra a presença de partículas ou biofilmes aderentes<sup>57</sup>.

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 parêntese ultrassônico, onde a energia gerada resultará na liberação dos microrganismos<sup>58</sup>.

Com esse intuito, estudos de diferentes métodos laboratoriais no controle de formação de biofilmes, como a aplicação do vortex e ultrassom, são de extrema importância para

pesquisas feitas com bactérias cultivadas *in vitro*, em superfícies comumente usadas na indústria de alimentos.

### 2.2.1.1 CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES

As doenças transmitidas por alimentos e a resistência aos antimicrobianos são questões internacionais de saúde. A resistência microbiana pode ser conceituada como a habilidade de um microrganismo continuar a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano<sup>59</sup>, sendo o principal efeito colateral de seu uso porque leva à seleção de bactérias resistentes.

Antes do aparecimento e da larga expansão dos antibióticos foi sugerido que as infecções bacterianas poderiam ser prevenidas ou tratadas com a administração de fagos. Hoje em dia, com a resistência aos antimicrobianos, os fagos são considerados agentes terapêuticos potencialmente atraentes devido às diversas características que possuem, como serem extremamente específicos e muito eficazes na lise de bactérias patogênicas, não patogênicos para o homem e animais, e rapidamente modificáveis para combater o aparecimento de novas ameaças bacterianas. Além destas características, os fagos apenas se replicam nos locais aonde se encontra a infecção. Os fagos líticos podem, portanto, ser agentes terapêuticos eficientes no controle da formação de biofilmes patogênicos<sup>60</sup>.

A interação entre fagos e biofilmes é um processo complexo. Um biofilme deveria ser mais rapidamente infectado do que células no estado planctônico, visto que as células que compõem o biofilme estão próximas, o que facilita a interação fago-hospedeiro. No entanto, a estrutura e composição do biofilme, limitam a infecção fágica. A remoção do biofilme irá depender da sua idade e condições. Estudos *in vitro* mostram que fagos conseguem infectar biofilmes de forma eficiente, reduzindo 60 a 97% de biomassa<sup>32</sup>.

A terapia fágica poderia ser proposta como um agente controlador de biofilmes e seria uma forma de reduzir o uso de agentes químicos, como antimicrobianos e sanitizantes<sup>61</sup>. A maioria dos microrganismos patogênicos são resistentes a esses agentes, devido à utilização indiscriminada tanto na avicultura comercial quanto no tratamento inadequado de pacientes acometidos por doenças.

Os probióticos são microrganismos vivos ou misturas microbianas administradas para melhorar o equilíbrio nos ambientes do trato gastrointestinal e vaginal. A levedura *Saccharomyces boulardii* e a bactéria *Lactobacillus rhamnosus* GG são as mais usadas para

essa finalidade. O mecanismo de ação dos probióticos inclui a produção de substâncias como bacteriocinas, biosurfactantes, ácidos e peróxidos, que inibem o crescimento de patógenos<sup>32</sup>. Neste sentido, os probióticos constituem uma alternativa para controlar a formação de biofilmes associados à saúde, devido à ações profiláticas ou como agentes antiadesivos do biofilme pelo seu mecanismo de competição<sup>32</sup>.

Antimicrobianos naturais, como ácidos láctico, acético, sórbido e cítrico, e óleos essenciais podem ser uma boa estratégia para controlar a formação de biofilmes. São usados como agentes terapêuticos desde a antiguidade e com ampla aplicabilidade, e também podem ser utilizados na área de alimentos com essa finalidade. As bacteriocinas e inibidores de *Quorum sensing* (moléculas sinalizadoras) também são estratégias de controle da adesão microbiana e da formação do biofilme<sup>32</sup>.

No setor industrial, inúmeros custos estão associados às estratégias usadas no combate da formação de biofilmes, como o controle químico. O uso de limpeza mecânica e ação de detergentes são usados, mas a aplicação de sanitizantes ainda é a forma mais usual de controle de biofilmes na indústria. Já é evidente uma resistência microbiana a sanitizantes, sendo necessário encontrar novas maneiras e compostos para o controle dos biofilmes<sup>32</sup>.

### 2.3 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF) no relatório anual de 2013, a produção de carne de frango chegou a 12,645 milhões de toneladas em 2012, em uma redução de 3,17% em relação a 2011. Em 2013, esse valor foi de 12,30 milhões de toneladas. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno e 31% para exportações<sup>1</sup>.

A indústria avícola brasileira tem um bom desempenho devido a sistemas de tecnologia avançados que fazem do Brasil o maior exportador mundial de carnes de frango, permitindo à população adquirir um produto de boa qualidade a baixos custos<sup>3</sup>. Aliado a isso se tem a necessidade de manutenção da sanidade dos plantéis avícolas e, também, das condições higiênico-sanitárias dentro dos abatedouros.

A higiene na indústria de alimentos se insere dentro das boas práticas de Fabricação (BPF) e dos programas de qualidade, como o de Análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), visando a obtenção de alimentos seguros. Durante o processo de

fabricação de alimentos, ocorre acúmulo de materiais indesejáveis, como restos de alimentos, substâncias químicas do processo e microrganismos. Esses materiais indesejáveis são designados de “resíduos” ou “sujidade”<sup>62</sup>.

No processo de fabricação vários tipos de superfícies são utilizadas no processamento do alimento, como o aço inoxidável e os polímeros, que sofrem desgastes com o uso repetido e aumentam a possibilidade do acúmulo de sujidades e bactérias<sup>63</sup>. Dentre os materiais mais utilizados em equipamentos para a preparação de alimentos, tanto em nível industrial quanto doméstico, o aço inoxidável tem sido o material de escolha devido à sua resistência à corrosão e oxidação, por ter uma maior durabilidade, por ser de fácil fabricação e também por ter uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado com cobre, alumínio e com a ampla variedade de polímeros<sup>63,64</sup>.

Para o processamento de alimentos, também se destacam as esteira de poliuretano e os utensílios fabricados com polietileno, principalmente placas de corte. Um dos principais cuidados com essas placas é a contaminação cruzada, a qual está muito relacionada com a capacidade de adesão das bactérias contaminantes, principalmente por *Salmonella* spp.<sup>65</sup>. As placas de corte de polietileno apresentam superfícies irregulares, o que facilita a deposição de material orgânico dificultando a ação dos agentes desinfetantes<sup>66</sup>.

Toda planta de uma indústria alimentícia deve ser limpa e sanificada após o término do processo produtivo, e para isso há fases de higienização: I) remoção de resíduos sólidos; II) pré-enxague com água quente (45°C); III) Aplicação de detergente; IV) Enxágue com água; V) Sanitizantes e VI) Enxágue com água. Esse processo é realizado em 12 horas e 24 horas no final do turno de abate, denominada higiene pré-operacional. Durante o dia, em tempos de 4 e 8 horas é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização durante intervalos na produção, que envolve etapas de remoção de resíduos sólidos e enxague<sup>67</sup>.

O procedimento de higienização nos matadouros de aves consiste fundamentalmente no uso de água quente a 45°C, que garante as etapas de enxague, cuidando com elevadas temperaturas que coagulam proteínas e propiciam maior aderência em superfícies levando a formação de biofilmes. O uso de água quente a 85°C para higienização de utensílios como facas de corte, e o uso de detergentes e sanificantes, como o ácido peracético e amônia quaternária, são comumente utilizados nos processos de higienização de salas de corte nos frigoríficos do Brasil<sup>67</sup>.

Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir microrganismos alteradores e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária<sup>68</sup>.

O sanitizante deve ser selecionado levando-se em conta algumas características: aprovação pelos órgãos competentes, apresentarem amplo espectro de ação antimicrobiana e capacidade de destruir os microrganismos, serem estáveis e com baixa toxicidade e corrosividade. A ação dos sanitizantes é afetada pelas características da superfície, tempo e temperatura de contato, concentração de uso, tipos de resíduos presentes nas superfícies, pH, propriedades físico-químicas da água, substâncias inativadoras e, ainda, o tipo e a quantidade de microrganismos contaminantes<sup>69</sup>.

O ácido peracético é um sanitizante que possui algumas vantagens, como não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, ter baixo impacto ambiental e ser relatado como eficaz contra biofilmes. É um sanitizante considerado esporicida, bactericida e fungicida, sendo excelente contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos, leveduras, vírus e esporos bacterianos<sup>64</sup>. Possui desvantagens como sua ação irritante para pele, liberação de vapores irritantes, odor forte, incompatibilidade com cobre, ferro e alumínio e baixa estabilidade de estocagem<sup>70</sup>. Possui como mecanismo de ação a oxidação de grupos sulfidrila das enzimas, pela interferência em processos metabólicos e na função quimiosmótica da membrana citoplasmática<sup>69</sup>.

Os compostos de amônia quaternária (*quats*) são largamente utilizados como antissépticos e desinfetantes, devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbiocida<sup>71</sup>. São detergentes catiônicos sintéticos com atividade antimicrobiana, sendo eficientes contra bactérias, bolores, leveduras e vírus<sup>72</sup>. É eficiente sobre bactérias Gram positivas e microrganismos termodúricos, mas apresentam baixa ação sobre bactérias Gram negativas, coliformes e psicrotóxicos e são ineficientes contra esporos<sup>69</sup>.

Sua ação é devido à inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, à desnaturação das proteínas celulares e à ruptura da membrana celular<sup>73</sup>. Esta destruição das células bacterianas depende da concentração do desinfetante, da natureza e densidade da célula bacteriana, do tempo de contato, da temperatura do meio, do pH e da presença de matéria orgânica<sup>74</sup>. O mecanismo de ação da amônia quaternária é pela

interferência nas propriedades de permeabilidade da membrana celular, que causa a desnaturação proteica e inibição enzimática<sup>69</sup>.

Segundo a Portaria nº 210 de 1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, os estabelecimentos que realizarem cortes e/ou desossa de aves devem garantir temperatura ambiente não superior a 12°C e o resfriamento dos produtos de aves a uma temperatura da água do chiller de no máximo 4°C, respeitando, assim, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves<sup>75</sup>. Entretanto, os estabelecimentos que exportam seus produtos para a União Europeia (UE) devem garantir temperatura ambiente não superior a 10°C nas salas de corte.

Partindo deste pressuposto, nosso trabalho mimetiza as temperaturas preconizadas em abatedouros avícolas: 3±1°C (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C); 9±1°C (temperatura da sala de cortes para UE, máximo 10°C); 25±1°C (temperatura ambiente); 36±1°C (padrão ótimo para crescimento de mesófilos) e 42°C±1°C (temperatura de enriquecimento seletivo pela termotolerância de *Salmonella* e, devido a posteriores estudos com bactérias termófilas, como *Campylobacter*, para pesquisa de biofilmes multiespécies).

A refrigeração dos produtos avícolas entre 4 e 8°C, tem demonstrado diminuir a intensidade de crescimento de *Salmonella*. Em alimentos como a carne de frango, onde diversas intervenções tentam reduzir o agente patogênico, mais investigações são necessárias para proporcionar uma temperatura ótima de refrigeração que realmente iniba o crescimento da *Salmonella*, sendo importante para a manutenção da vida de prateleira e para reduzir custos no processo. É essencial estudar os padrões de crescimento de *Salmonella* Enteritidis em temperaturas de refrigeração, já que são escassos os dados sobre crescimento em baixas temperaturas<sup>76</sup>.

Diversas técnicas de microscopia podem ser utilizadas para a visualização dos processos de aderência, crescimento e formação do biofilme. A visualização da microtopografia dos biofilmes é muito importante, pois fornece a possibilidade de análise desde o início dos agregados celulares até a formação praticamente consolidada das EPS, além da observação de rugosidade dos materiais. De acordo com Wimpenny et al.<sup>77</sup>, a microscopia eletrônica de varredura pode ser uma informação útil sobre a superfície estrutural de um biofilme, apresentando mais um dado para o trabalho, enriquecendo a pesquisa sobre biofilmes.

Neste contexto, a avaliação de formação de biofilmes de *S. Enteritidis* e a mimetização de procedimentos de higiene pré-operacional e operacional nas superfícies de contato com alimento, é de grande relevância na avaliação das condições higiênico-sanitárias de

abatedouros de aves, por auxiliar a indústria avícola a ter um maior conhecimento das reais condições dos abatedouros no Brasil, levando a um aprimoramento das condições higiênicas destes estabelecimentos.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **The Use of Vortex and Ultrasound Techniques for the *in vitro* Removal of *Salmonella* spp. Biofilms**

Bruna Webber<sup>1</sup>, Raíssa Canova<sup>1</sup>, Luciana Maria Esper<sup>2</sup>, Gustavo Perdoncini<sup>3</sup>, Vladimir Pinheiro do Nascimento<sup>3</sup>, Fernando Pilotto<sup>1</sup>, Luciana Ruschel dos Santos<sup>1</sup> & Laura Beatriz Rodrigues<sup>1</sup>

(Artigo submetido para a *Acta Scientiae Veterinariae*)

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil. <sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brazil. <sup>3</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: B. Webber [[brunahw@hotmail.com](mailto:brunahw@hotmail.com) - Tel.: +55 (54) 91826618]. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) – UPF. BR 285, Bairro São José. CEP 99052-900 Passo Fundo, RS, Brazil.

## ABSTRACT

**Background:** The presence of biofilms is common to all types of surfaces, such as stainless steel. Once formed, biofilms act as constants points of contamination that may affect the microbiological quality of products. The laboratory methods are being used and tested in vitro for removal and the subsequent quantification of biofilms, including the use of vortex and ultrasound. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of these two laboratory methods for removing *Salmonella* spp. biofilms, in vitro cultured on stainless steel surface from the food industry.

**Materials, Methods & Results:** Three strains were analyzed for biofilm formation by *Salmonella* spp., and they are *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Enteritidis* isolated from drag swab on poultry farm and genetically confirmed, denominated P106. Were used coupons of stainless steel AISI 316, area of 1 cm<sup>2</sup>. Biofilms were formed using TSB broth without glucose and incubated at 36°C for 24 h. Were realized six replicates for each microorganism in each removal method. After the biofilm formation, two methods were used in the removal stage, the vortexing, performed for 2 min, and sonication method, with coupons maintained for 10 min in an ultrasound bath, at a frequency of 40 kHz and potency 81 W. Serial dilutions were made and transferred to PCA agar for quantification in log<sup>10</sup>.UFC.cm<sup>-2</sup>. The microtopography was performed by scanning electron microscopy (SEM) of surfaces before removal step. Statistical analysis of the results showed no significant difference between the two removal methods and between the three strains studied ( $P > 0.05$ ).

**Discussion:** Biofilms can be attached to any surface, biotic or abiotic. This adhesion of bacterias, especially pathogenic, can cause serious hygiene problems and economic losses due to impairment the microbiological quality of the products. Food safety is a concern for

consumers and for the food industry, as well as the agencies responsible for public health. Researchs involving studies with the formation of microbial biofilms becomes increasingly present. Laboratory methods are used for removing biofilms in vitro and subsequent quantification. Among them is the use of the vortexing and ultrasound. The vortexing acts through tourbillon movements, removing or reducing the adhesion of microorganisms on a surface. Ultrasound destabilizes the structure of the biofilm, dislodging bacterial aggregates through physical, chemical and mechanical results of the cavitation process. These processes are responsible by the cleaning of surfaces with presence of adhered particles. In our study there was no statistical difference between the two removal methods, vortexing and ultrasound. There was also no significant difference between *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and SE P106, which confirms the similarity between the two methods and among the studied strains. Although there was no statistical difference between the tested methods, the use of ultrasound in moderate frequency and for 10 min, will be used as standard for detachment of biofilms formed in vitro, due to their hydrodynamic properties that destabilize the structure of the biofilm.

**Keywords:** *Salmonella*, biofilms, vortex, ultrasound, detachment.

## **INTRODUCTION**

The presence of biofilm is common to all types of surfaces [16], who suffer wear with repeated use and increase the possibility of accumulation of soiling and bacteria [10]. Once formed acts as a constant contamination points, releasing fragments or planktonic cells of

microorganisms, as *Salmonella* spp., may compromise the microbiological quality of products [8].

Among the materials used in equipments, stainless steel has been the major material of choice due to its resistance to corrosion and oxidation, by having greater durability and ease of cleaning and disinfection process [10,16].

Laboratory methods are been used and tested *in vitro* for removal and subsequent quantification of biofilm, including the use of vortex and ultrasound [12]. The vortex is a method often used in biofilm studies, and acts by swirling movements, through the effect of water flow motion. As a result removes or reduces the adhesion of microorganisms on a surface [15]. Ultrasound, when used in moderate frequency (20 kHz e 40 kHz), detach bacterial aggregates, acting through physical effects, resulting from chemical and mechanical acoustic cavitation [13].

With this aim, it sought to evaluate the efficacy of two laboratory methods, vortex and ultrasound, to remove biofilm of *Salmonella* spp., cultivated *in vitro*, in stainless steel surface from the food industry.

## **MATERIALS AND METHODS**

The assays for comparison of methodologies for biofilms removal were performed in Bacteriology and Mycology Laboratory in the Veterinary Hospital at Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo (FAMV/UPF).

### **Samples of *Salmonella* spp.**

Three strains were analyzed for biofilm formation by *Salmonella* spp., and they are *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Enteritidis* isolated from drag

swab on poultry farm and genetically confirmed by Microarray by Check&Trace<sup>1</sup> equipment, denominated P106. They were stored in *Brain-Heart Infusion* broth (BHI)<sup>2</sup> with 20% glycerol<sup>3</sup> frozen at -20°C. Were reactivated utilizing BHI<sup>2</sup> broth, incubated at 36 ± 1°C for 18-24 h, then plated on Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (XLD)<sup>2</sup> and incubated at 36 ± 1°C. After 24 h was observed the pattern of colonies to assess whether they were compatible with *Salmonella* spp., and confirmed with biochemical and sorological tests.

### **Preparation of specimens**

As specimens were utilized coupons of stainless steel AISI 316 with an area of 1 cm<sup>2</sup> made in the dimensions of 1 cm X 1 cm and 0.1 cm of thickness. The materials used for the coupons were obtained from the equipments at cuts room in poultry slaughterhouse. The coupons were submitted to the following process: a) manual cleaning with sponge, water and liquid neutral detergent; b) rinse with distilled water; c) immersion in 70% ethanol (v/v) for 1 h at room temperature; d) rinse with distilled water; e) sterilization by autoclaving at 121°C for 30 min.

### **Biofilm Formation**

For the biofilm formation it was used onto 12-well, flat-bottomed sterile polystyrene microtiter plates<sup>5</sup>. Were placed 2,75 mL of TSB without glucose<sup>4</sup> in each well with the stainless steel coupon and added 250 µL with approximately 10<sup>3</sup> CFU/mL of *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Enteritidis* SE106, incubated at 36°C for 24 h. All tests were conducted with six replicates for every microorganism individually and for the single removal method. The coupon was removed with sterile tweezers and immersed in 5 mL of peptone water (AP)<sup>1</sup> at 0.1% for 1 min to remove planktonic cells. After was transferred to another tube with 10 mL of AP<sup>1</sup> at 0.1% to removal of sessile cells.

### **Techniques for biofilm removal**

After the biofilm formation, two methods were used in the removal step, the vortexing, performed for 2 min [15], and sonication method [16], with coupons maintained for 10 min in an ultrasound bath, at a frequency of 40 kHz and potency 81 W. Serial dilutions were made and transferred to PCA agar<sup>1</sup> for quantification with drop plate. To this end, the plate was divided into sectors and inoculated five drops of 10  $\mu$ L of each dilution, incubated at 36°C for 24 h. To determine the result was applied the formula:  $\text{CFU.cm}^{-2} = (V_D/V_A).A_v.D/A$ , as follow:  $V_D$ : diluent volume used for rinse (mL),  $V_A$ : volume of the aliquot used in the plating (mL),  $A_v$ : average of the counting obtained on the plates (CFU),  $D$ : dilution used for counting,  $A$ : coupon area ( $\text{cm}^2$ ), and expressed in  $\log^{10}.\text{UFC.cm}^{-2}$  [4,9].

### **Scanning Electronic Microscopy**

The microtopography of the surfaces was performed by scanning electronic microscopy (SEM) at the Electron Microscopy Center (CME) da UFRGS [18]. The coupons were immersed in 10 mL of PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.31M, pH 7.2) for 1 min, for removal planktonic cells, and fixed with glutaraldehyde 2.5%<sup>3</sup>. After, were rinsed with 0.2 M phosphate buffer. Dehydration was carried out using acetone at 30%, 50%, 70%, 90% and 100%. After complete dehydration, the samples were placed in a critical point drying, and following on *stubs* for metallization.

### **Statistical Analysis**

The results obtained were examined by analysis of variance (ANOVA). The comparison of means was performed with Tukey test at 5% probability ( $P > 0.05$ ).

## RESULTS

All the three strains of *Salmonella* spp. formed biofilm after 24 h incubation in stainless steel, as can be seen in Figure 1. After removal and quantification, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) between *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and SE P106. Either, there was no significant difference between the two removal methods, vortexing and sonication by ultrasound ( $P > 0.05$ ), according Table 1, confirming the similarity between the two methods and among the strains studied.

## DISCUSSION

Biofilms are communities consisting of sessile cells, mono or multispecies [7]. They may be in any surface, biotic or abiotic, and are surrounded by a matrix of organic polymers, strongly adhered through of protein or polysaccharide filaments, known as extracellular polymeric substances (EPS) [3,5]. Adherence these bacteria, particularly the pathogenic, may cause serious hygienic problems and economic losses due to impairment of microbiological quality [2].

Although the use of food processing techniques and advanced hygienization in industry, the increasing number and severity of foodborne diseases around the world have increased considerably, worrying the consumers, as well as the agencies responsible for public health, in relation to quality of food [14].

Research with microbial biofilm formation it becomes ever more present, and different laboratory methods may be used for removing biofilms *in vitro* to subsequent quantification, including the vortex and ultrasound [12].

The vortexing is a methodology used in biofilm studies, and acts through typical tourbillon movements, by the effect of the water flow motion and as a result removes or reduces the adherence of microorganisms on a surface [15]. Despite the similarity between methods, ultrasound features cavitation effect, that is the formation of cavities or bubbles in the liquid medium, generating some gas, which may cause structural or functional changes in the cells due to disruption of molecular bonds [6]. Scherba *et al.* [17] demonstrated that a hydrodynamic property of the ultrasound destabilizes the biofilm structure at frequency of 26 kHz, and the higher the intensity and the time of exposure, is greater the breaking of biofilm.

The sonication with ultrasound bath is able to inactivate the bacteria when used at high frequencies (512 kHz and 850 kHz). However, when used in moderate frequency (between 20 kHz and 40 kHz), acts dislodging bacterial aggregates through physical, chemical and mechanical effects of acoustic cavitation [13].

During this process, cavitation bubbles will produce enough energy to mechanical weaken bacteria or cells. This may happen through numerous processes, such as change in the bacterial surface induced by cavitation; pressure gradient, resulting from the collapse of gas bubbles colliding with the surface of biofilm; shearing force inside the biofilm; and chemical attack due to radical formation, such as H and OH<sup>-</sup>, during the cavitation, weakening the biofilm [13]. These processes are responsible for cleaning of surfaces with presence of adhered particles. Similar results are cited by Lindsay & Holy [12], who studied the biofilm removal of *Pseudomonas fluorescens* in stainless steel surface, by three different methods, including the use of vortexing and ultrasound, and no significant differences was found.

Ultrasonic equipments have been used to estimate microbial contamination of surfaces. However, these must be small enough and removable so that they can be immersed in diluent and put on the ultrasonic device, where the energy generated will result in release of

the microorganisms [11]. We also emphasize the facility of using the ultrasound bath by the researcher compared to the vortexing in the removal of biofilms.

Ali *et al.* [1] evaluated the biofilms removal in ultrasound bath at different times, 5, 10, and 15 min, and observed that there was no statistical difference between the sonication times. Thus, they selected 10 min for use in all the tests, since the recovery of cells were consistent and elevated, and this time reduce the possibility of cell damage caused by prolonged sonication.

Based on this assumption, the ultrasound, when employed in frequency and time proper, becomes an excellent method for detachment of biofilms *in vitro*, mainly by destabilizing the biofilm properties and the usability.

## CONCLUSION

Although there was no statistical difference between the tested methods, the use of ultrasound in moderate frequency (40 kHz) for 10 min. will be used as standard for detachment of biofilms formed *in vitro*, due to their hydrodynamic properties that destabilize the structure of the biofilm.

## SOURCES AND MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Check&Trace, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany.

<sup>2</sup>HiMedia<sup>®</sup> Laboratories. Mumbai, Índia.

<sup>3</sup>Vetec<sup>®</sup> Química Fina Ltda. Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>Difco<sup>®</sup> Microbiologia. Sparks, USA.

<sup>5</sup>Nest<sup>®</sup> Produtos Laboratoriais. Brazil.

**Acknowledgements.** The authors wish to acknowledge the FAPERGS (Edital 001/2013 GR, Project: 1997-2551/13) for the financial support for conducting this study, and the scholarship provided by CAPES/PROSUP/UPF.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCES

- 1 **Ali L., Khambaty F. & Diachenko G. 2005.** Investigating the suitability of the Calgary Biofilm Device for assessing the antimicrobial efficacy of new agents. *Bioresource Technology*. [doi:10.1016/2005/08025].
- 2 **Andrade N.J. 2008.** Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, pp.78-125.
- 3 **Azevedo N.F & Cerca N. 2012.** Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria. Porto: Publindústria Edições Técnicas, pp.23-50.
- 4 **Careli R.T. 2005.** Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos. 81 f. Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa.
- 5 **Costerton J.W., Stewart P.S. & Greenberg E.P. 1999.** Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. (284): 1318-1322.

- 6 **Domingos R.N. 1998.** Contribuições e usos do ultrassom de média intensidade no preparo de catalizadores e produção ativada de etanol, Tese de Livre Docente em Termodinâmica, Instituto de Geociências e Ciências Exatas - UNESP - Rio Claro (SP), pp.34-47.
- 7 **Donlan R.M. & Costerton J.W. 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(2): 167-193.
- 8 **Fuster-Valls N. 2008.** Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 19(3): 308-314.
- 9 **Gibson H. 1999.** Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. (87): 41-48.
- 10 **Holah J.T. & Thorpe R.H. 1990.** Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology*. 69(4): 599-608.
- 11 **Jay J.M. 2005.** Microbiologia de Alimentos. Porto Alegre, 6 ed.: Artmed. 711 p.
- 12 **Lindsay D. & Holy A.V. 1997.** Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*. (14): 383-390.
- 13 **Mason T.J., Duckhouse H., Joyce E. & Lorimer J.P. 2003.** Uses of ultrasound in the biological decontamination of water. *WCU*. Paris: Setembro, pp.7-10.
- 14 **Morelli A.M.F. 2008.** *Escherichia coli* 0157:H7: ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes. 173f. Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- 15 **Parizzi S.Q.F., Andrade N.J., Silva C.A.S., Soares N.F.F. & Silva A.M.S. 2004.** Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*. (47): 77-83.

- 16 Rossoni E.M.M. & Gaylarde C.C. 2000.** Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*. (61): 81-85.
- 17 Scherba G., Eigel R.M. & O'Brien W.D. 1991.** “Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy”. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(7): 2079-2084.
- 18 Souza W.** Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Rio de Janeiro: *Sociedade de Microscopia Eletrônica*, 1998, pp.1-44.

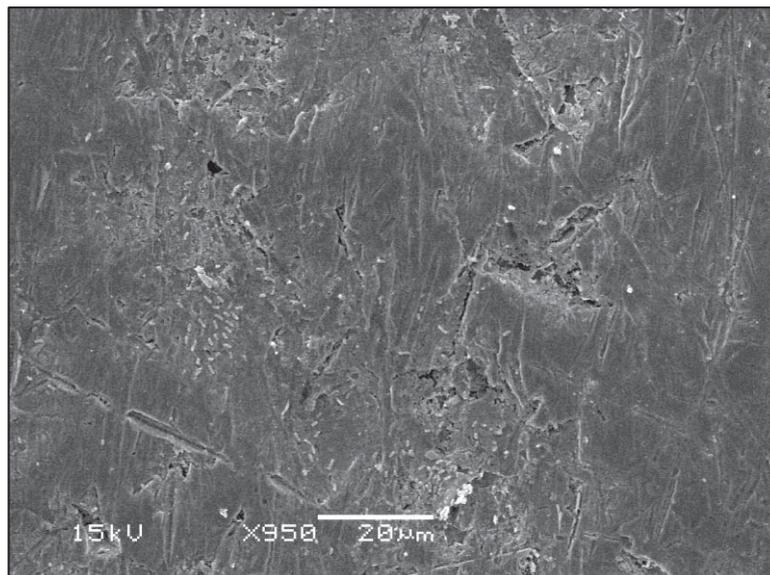
### Legends and Foot Notes:

**Table 1.** Vortexing and ultrasound methods in removing biofilms *in vitro* formed by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Enteritidis P106.

SAMPLES	VORTEXING (log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> )	ULTRASOUND (log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> )
<b>S. Typhimurium</b>	7,0264 A a	7,6297 A a
<b>S. Enteritidis</b>	7,2717 A a	7,6831 A a
<b>SE P106</b>	7,1681 A a	7,2092 A a

Means followed by the same capital letters in the lines and small letters in the same column, do not differ in the Tukey test ( $P > 0.05$ ).

**Figure 1.** Stainless steel surface with biofilm formation by *S. Enteritidis* ATCC 13076.





Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Veterinária  
Acta Scientiae Veterinariae  
ISSN 1679-9216 (on line)

Fax: +55 51 3308-7305  
Phone: +55 51 3308-6964

e-mail: laerte.ferreiro@ufrgs.br  
<http://www.ufrgs.br/actavet/>



## RECEBIMENTO DE ARTIGO

Porto Alegre, 17 de Junho de 2015.

**Autores:** Bruna Webber, Raissa Canova, Luciana Maria Esper, Gustavo Perdoncini, Vladimir Pinheiro do Nascimento, Fernando Pilotto, Luciana Ruschel dos Santos & Laura Beatriz Rodrigues

**Título do Trabalho:** The Use of Vortex and Ultrasound Techniques for the *in vitro* Removal of *Salmonella* spp. Biofilms

O referido trabalho foi recebido para análise e está protocolado como ASV 6-18-2015.

Atenciosamente,

Laerte Ferreiro  
Editor - ASV

## 4. CAPÍTULO 2

# DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Salmonella* ENTERITIDIS SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E O EFEITO DE TRATAMENTOS DE REMOÇÃO

B. Webber<sup>a\*</sup>, AP. Oliveira<sup>a</sup>, E. Pottker<sup>a</sup>, L. Daroit<sup>b</sup>, LR. Santos<sup>b</sup> and LB. Rodrigues<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Master's Graduate in Bioexperimentacion Program, Scholarship PROSUP / Capes of the University of Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil;* <sup>b</sup> *Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil.*

\* Corresponding author. E-mail: [brunahw@hotmail.com](mailto:brunahw@hotmail.com)

**Key words:** *Salmonella* Enteritidis, Biofilmes, Temperaturas de incubação, Superfícies, Higienização.

**Running title:** DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Salmonella* ENTERITIDIS

## **Abstract**

Avaliou-se o efeito da temperatura na capacidade de *Salmonella* Enteritidis (SE) formar biofilme em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano e processos de higienização. Corpos de prova foram postos frente a culturas bacterianas e incubados a  $42\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $36\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $9\pm 1^\circ\text{C}$  e  $3\pm 1^\circ\text{C}$ , por 4, 8, 12 e 24 horas. Para higienização foram testadas águas aquecidas a  $45^\circ\text{C}$  e  $85^\circ\text{C}$ , e soluções de ácido peracético e amônia quaternária. As SE aderiram mais ao polietileno que ao poliuretano e ao aço inoxidável. Houve formação de biofilmes em todas as temperaturas, ressaltando a  $3^\circ\text{C}$ , temperatura ainda não citada para adesão de SE. O ácido peracético e a água a  $85^\circ\text{C}$  tiveram ação semelhante seguido da amônia quaternária, já a água a  $45^\circ\text{C}$  não foi eficaz. Todos os materiais propiciaram a aderência de SE até mesmo em temperaturas baixas, consideradas até então seguras para a conservação dos alimentos.

## **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, especialmente na Europa, onde responde por 85% dos casos (Miljkovic-Selimovic et al. 2010). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*), até o ano de 2013 a SE estava entre os 15 sorovares mais sorotipificados em seres humanos, na alimentação humana, em animais, meio ambiente e na alimentação animal (WHO 2014).

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 (Cardoso et al. 2000; CDC 2013). Com isso se torna essencial o seu controle em abatedouros avícolas, por possuir relevância como causadora de doenças veiculadas por alimentos. Conseqüentemente, além das preocupações de saúde pública (CDC 2014a), tem reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações.

Outra grande preocupação em relação às condições higiênico-sanitárias dos abatedouros avícolas é com a formação de biofilmes, que são microrganismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica e, uma vez constituídos, agem como pontos de contaminação constante, liberando fragmentos ou células, como de *Salmonella* spp, podendo comprometer a qualidade microbiológica de produtos (Fuster-Valls et al. 2008).

A SE pode aderir e formar biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno e poliuretano (Manijeh et al. 2008), sob diferentes condições de crescimento, entre essas diferentes temperaturas. 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.

Entretanto, 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). Lianou & Koutsoumanis (2012), observaram que a formação de biofilme é afetada por diferentes parâmetros ambientais, como temperatura, pH, osmolaridade e pressão atmosférica, e que esta formação aumentou à medida que as condições tornaram-se menos favoráveis para o microrganismo, Reuter et al. (2010) e Rode et al. (2007) corroboram essa afirmativa.

Microrganismos em forma de vida sésil resistem significativamente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização (Costerton et al. 1995; Steenackers et al. 2012). Uma vez o biofilme formado atua como uma barreira física que impede ação de agentes sanitizantes (Costerton et al. 1995; Stepanovic et al. 2004), tornando a eliminação desses patógenos um grande desafio em instalações de processamento de alimentos.

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, nos tempos de formação 4, 8, 12 e 24 horas. A mimetização dos procedimentos de higiene pré-operacional e operacional nas superfícies de contato com alimento foi realizado através de tratamentos com águas aquecidas a 45°C e 85°C, soluções de ácido peracético e amônia quaternária.

## **Materiais e Métodos**

Os testes de avaliação da formação de biofilmes foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV/UPF).

### ***Amostras de SE***

Foram analisadas duas amostras de *Salmonella* Enteritidis (SE) quanto à formação de biofilmes mono-espécie, previamente isoladas e confirmadas geneticamente por Microarray pelo equipamento Check&Trace (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). 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.

Elas estavam armazenadas congeladas em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI, HiMedia<sup>®</sup>) acrescido com 20% de glicerol e congeladas a -20°C. Foram reativadas, para verificar se estão puras, utilizando um meio de enriquecimento não seletivo (BHI, HiMedia<sup>®</sup>), posteriormente inoculadas em caldo Rappaport Vassiliadis (RV, HiMedia<sup>®</sup>), isoladas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD, HiMedia<sup>®</sup>) e incubadas a 37°C. Depois de 24 horas foi observado o padrão de colônias para avaliar a compatibilidade com *Salmonella* spp. e realizada confirmação bioquímica e sorológica.

#### ***Preparação de corpos de prova***

Foram utilizados, como corpos de prova, cupons de aço inoxidável AISI 316, poliuretano e polietileno limpos e esterilizados, com área de 1 cm<sup>2</sup>, confeccionados nas dimensões de 1 cm X 1 cm e 0,1 cm (espessura). Os materiais utilizados para a preparação dos cupons foram obtidos do ambiente de processamento de cortes de aves. Os cupons foram submetidos aos seguintes procedimentos: a) limpeza manual com auxílio de esponja, água e detergente neutro líquido; b) enxague com água destilada; c) imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente; d) enxágue com água destilada; e) esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos.

#### ***Formação do biofilme***

Para a formação dos biofilmes os corpos de prova foram cultivados individualmente em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços (Nest<sup>®</sup>). Foi adicionado 2,75 mL de caldo tripton de soja sem glicose (TSB, Difco<sup>®</sup>) e 250µL de culturas individuais de cada SE,

com aproximadamente  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> em cada poço. Esta população foi verificada, em todo o experimento, por semeadura em placas contendo Agar Padrão de contagem (PCA, HiMedia<sup>®</sup>).

Os corpos de prova de aço inoxidável, poliuretano e polietileno foram imersos na cultura de cada microrganismo e incubados a  $42\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $36\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $9\pm 1^\circ\text{C}$  e  $3\pm 1^\circ\text{C}$ , simulando as temperaturas do ambiente de processamento, ótimas dos microrganismos e de termotolerância, e avaliados nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas, simulando os períodos para higiene operacional e pré-operacional em abatedouros de aves (Rossoni & Gaylarde 2000; Kusumaningrum et al. 2003). Todos os ensaios foram realizados com três repetições. Resultou em 1125 ensaios de formações de biofilmes nas três superfícies, temperaturas e tempos, para cada amostra de SE, totalizando 2250 análises.

Nos tempos determinados, os cupons foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1% (AP, HiMedia<sup>®</sup>), 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), inoculando cinco gotas de 10 $\mu$ L de cada diluição, com leitura após 24 horas de incubação a 37°C.

Para determinar o resultado foi aplicada a fórmula:  $\text{UFC.cm}^{-2} = (V_D/V_A).A_v.D/A$ , como segue:  $V_D$ : volume do diluente usado no enxágue (5 mL),  $V_A$ : volume da alíquota usada no plaqueamento (0,05 mL ou 0,1 mL),  $A_v$ : média da contagem obtida nas placas (UFC),  $D$ : diluição usada na contagem,  $A$ : área do cupom (2 cm<sup>2</sup>), expresso em  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup> (Careli 2005; Gibson 1999, ISO 18593:2012).

### ***Avaliação dos procedimentos de higienização***

A eficácia dos tratamentos foi testada sobre os biofilmes formados nas três superfícies. Os corpos de prova, previamente incubados e após a remoção das células planctônicas, foram colocados em recipientes com 5 mL de água estéril aquecida a 45°C por 3 minutos, água estéril a 85°C por 3 minutos, e nas soluções de ácido peracético 0,5% (Kalykim<sup>®</sup>, Brazil) e amônia quaternária 1% (Kalykim<sup>®</sup>, Brazil), por um tempo de 5 minutos.

Após, os fragmentos foram imersos em 5 mL de Água peptonada 0,1% com agentes neutralizantes por 1 minuto (Joseph et al. 2001; ISO 18593:2012), introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água peptonada 0,1% e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom para desadesão de células sésseis (Scherba et al. 1991). Foi utilizado o método de contagem em gota (Drop plate).

### ***Análise estatística***

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 (SILVA 2014).

## **Resultados**

### ***Variabilidades das amostras***

Quando comparada as duas amostras de *Salmonella* Enteritidis, ambas de origem avícola, a SE 106 teve menor formação de biofilmes ( $4,7646 \log^{10} \cdot \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) quando comparada com a SE 84 ( $5,2575 \log^{10} \cdot \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), com diferença estatística ( $P < 0.05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis*. Médias das repetições.

CEPA	FORMAÇÃO*
	(MÉDIA**)
SE 84	5,2575 a
SE 106	4,7646 b

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

\* Resultados em  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>

\*\* Média geral da formação de biofilmes em todas as condições ambientais.

### *Efeito das temperaturas na formação do biofilme*

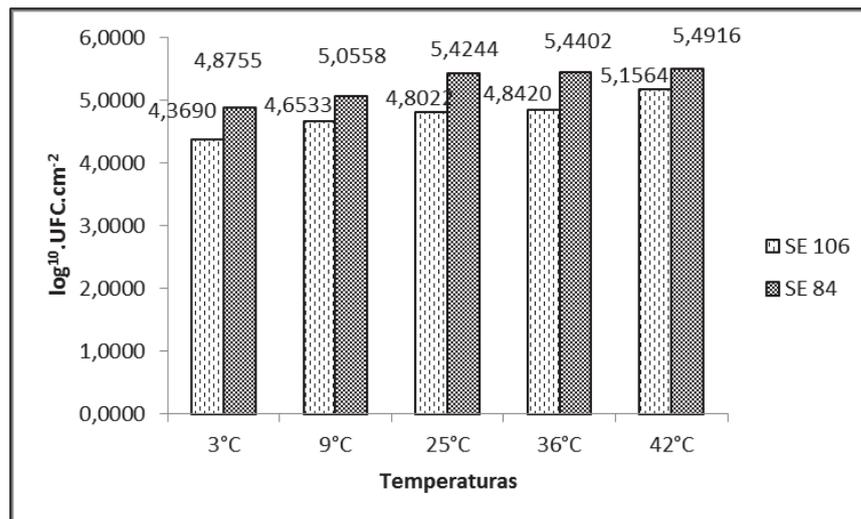
Quando avaliamos os resultados da formação de biofilmes pelas duas cepas de SE frente às diferentes temperaturas utilizadas para incubação, tanto a SE 84 como a SE 106, aderiram estatisticamente igual a 3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C. Ocorreu uma maior adesão da *Salmonella* com o aumento das temperaturas de incubação. *S. Enteritidis* possui a mesma capacidade de formar biofilmes sob refrigeração e temperaturas ótimas (Tabela 2 e Figuras 1, 2 e 3).

**Tabela 2.** Formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis* sob diferentes temperaturas de incubação. Médias das repetições, em todas as superfícies testadas.

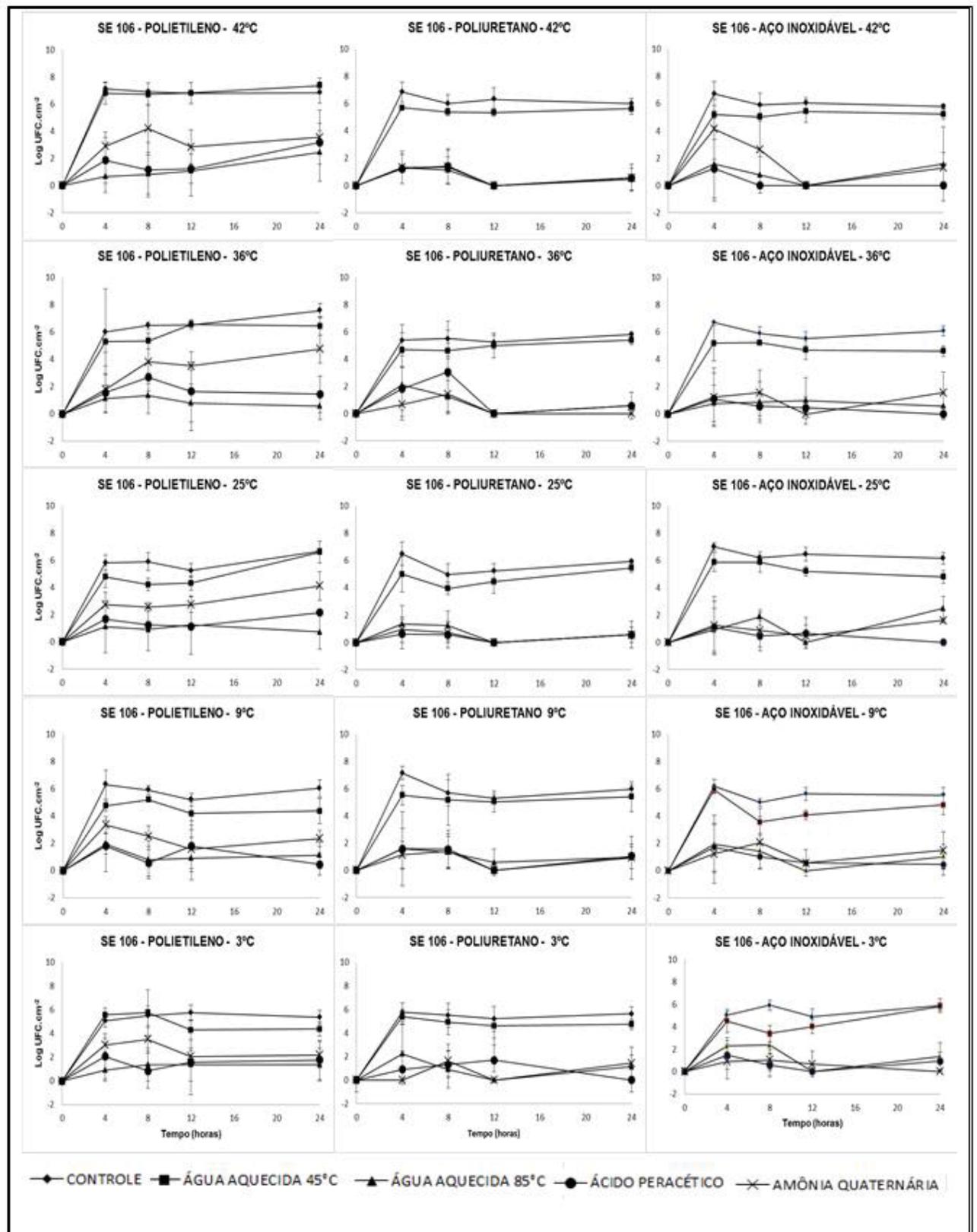
CEPA	TEMPERATURAS*				
	3°C	9 °C	25 °C	36°C	42°C
SE 84	4,8755 Aa	5,0558 Aa	5,4244 Aa	5,4402 Aa	5,4916 Aa
SE 106	4,3690 Aa	4,6533 Aa	4,8022 Aa	4,8420 Aa	5,1564 Aa

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

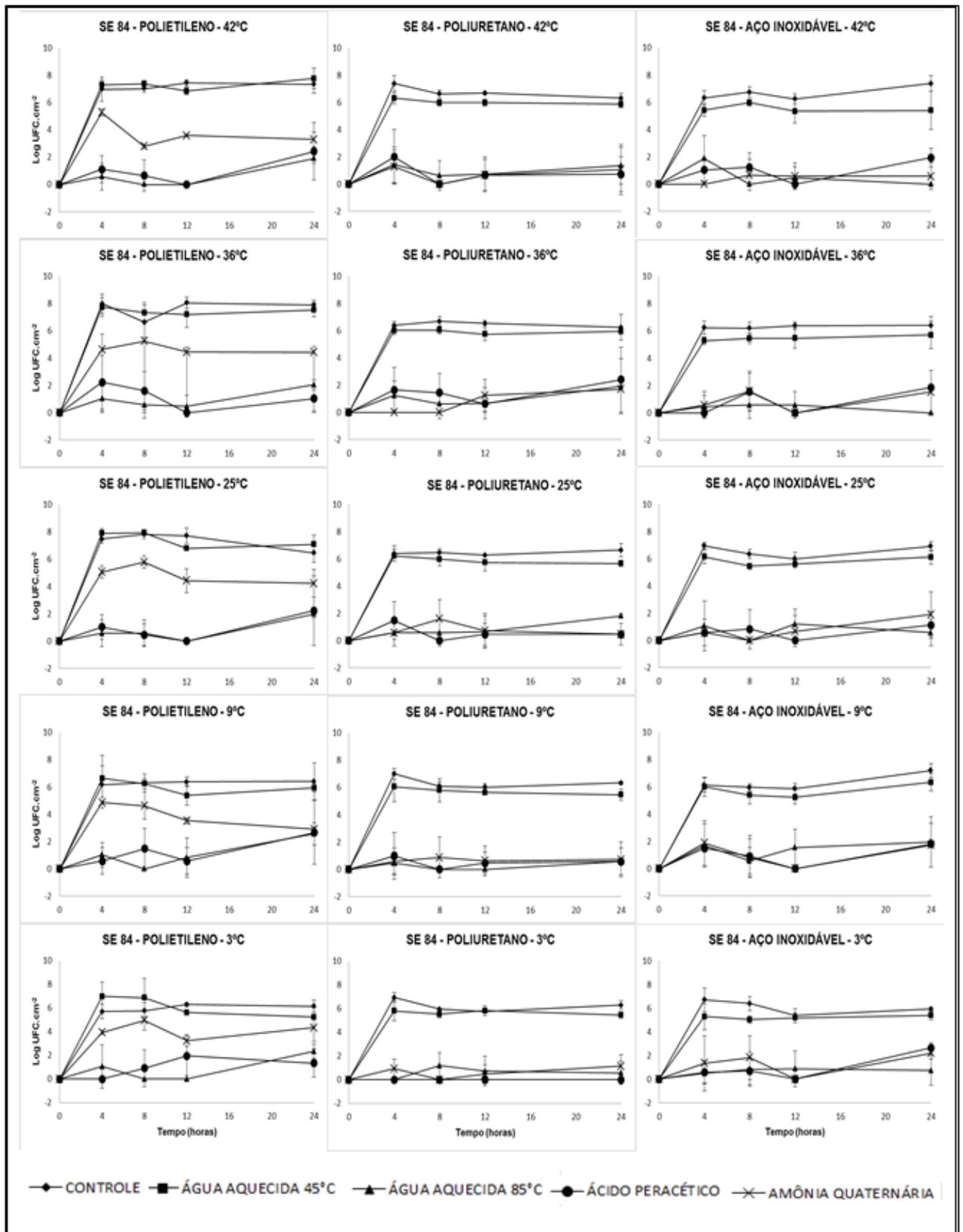
\* Resultados em  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>



**Figura 1.** Formação de Biofilme de *S. Enteritidis* de origem avícola, sob diferentes temperaturas de incubação.



**Figura 2.** Formação de biofilme pela *S. Enteritidis* 106 em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas e procedimentos de higienização.



**Figura 3.** Formação de biofilme pela *S. Enteritidis* 84 em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas e procedimentos de higienização.

### *Adesão microbiana às diferentes superfícies*

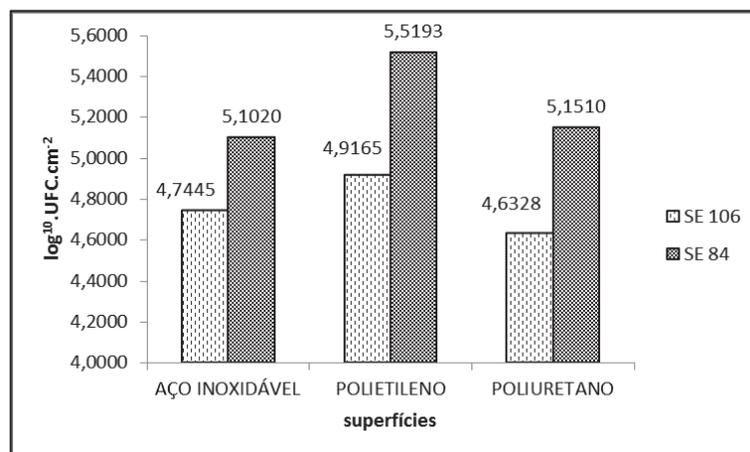
Houve formação de biofilme pelas SE em todas as superfícies, no aço inoxidável, poliuretano e polietileno. Entretanto, houve maior adesão no polietileno frente às demais superfícies avaliadas, mas sem diferença estatística. As médias de formação, de ambas SE, são visualizadas na Tabela 3 e Figura 4.

**Tabela 3.** Formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis* em polietileno, poliuretano e aço inoxidável. Médias das repetições, sob todas as temperaturas de incubação.

CEPA	SUPERFÍCIES*		
	Polietileno	Poliuretano	Aço inoxidável
SE 84	5,5193 Aa	5,1510 Aa	5,1020 Aa
SE 106	4,9165 Aa	4,6328 Aa	4,7445 Aa

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

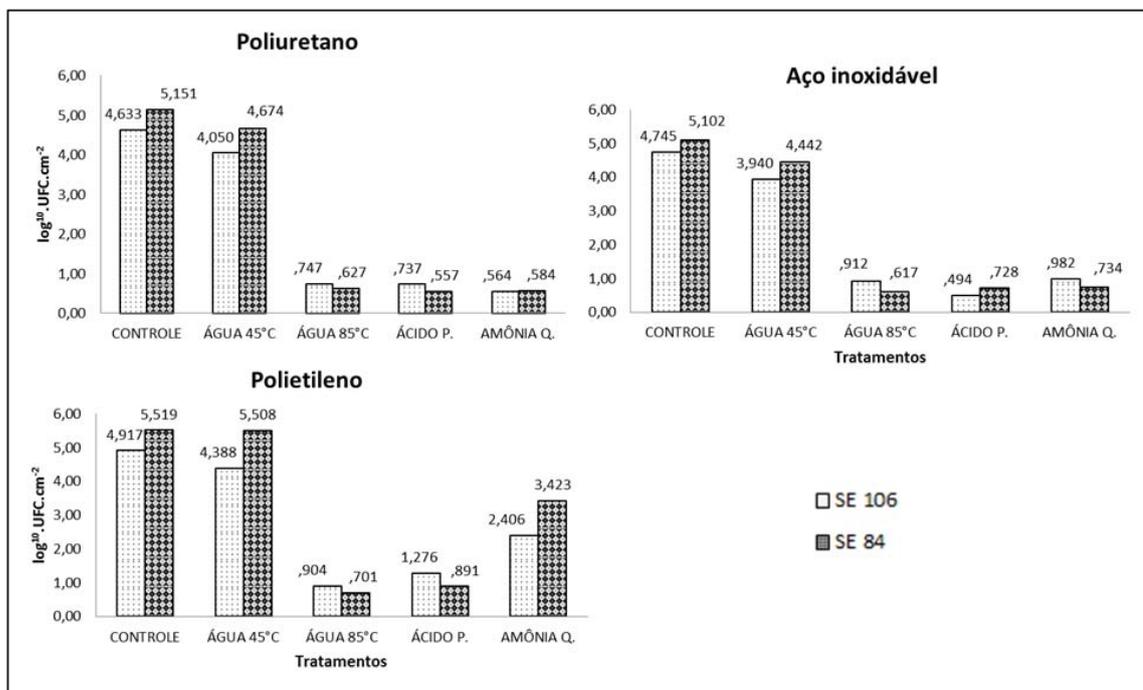
\* Resultados em  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>



**Figura 4.** Formação de Biofilme de *S. Enteritidis* de origem avícola em diferentes superfícies usadas na indústria de alimentos.

### Tratamentos de higienização

Frente aos tratamentos testados para remoção de biofilmes em ambas as estirpes, o ácido peracético e a água a 85°C apresentaram ação semelhante ( $P=0,989$ ) na remoção. A água a 45°C não foi eficaz na remoção de biofilmes, ficando muito próximo do controle. O outro sanitizante testado, a amônia quaternária, removeu biofilmes, mas com menor eficácia se comparada ao ácido peracético (Figura 5 e Tabela 4). Nessa figura também se observa a menor eficácia dos tratamentos na superfície de polietileno.



**Figura 5.** Remoção de Biofilme de *S. Enteritidis* de origem avícola, em aço inoxidável, polietileno e poliuretano, por diferentes procedimentos de higienização.

Legendas: Água 45°C: água estéril aquecida a 45°C; Água 85°C: água estéril aquecida 85°C; Ácido P.: ácido peracético; Amônia Q: amônia quaternária.

Com o uso do ácido peracético e amônia quaternária obtivemos uma redução média de  $4,23 \log^{10}.\text{UFC}.\text{cm}^{-2}$  e  $3,562 \log^{10}.\text{UFC}.\text{cm}^{-2}$ , respectivamente, no número de alteradores aderidos a todas as superfícies testadas, a água a 85°C reduziu  $4,26 \log^{10}.\text{UFC}.\text{cm}^{-2}$ . A água

aquecida a 45°C não atendeu as recomendações para higienização correta de uma superfície, com redução de somente 0,511  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4.** Quantificação da remoção de biofilmes por duas cepas de *S. Enteritidis* de origem avícola, por diferentes procedimentos de higienização. Médias das repetições.

CEPA	TRATAMENTOS*				
	CONTROLE	ÁGUA AQUECIDA 45 °C	ÁGUA AQUECIDA 85 °C	ÁCIDO PERACÉTICO	AMÔNIA QUATERNÁRIA
SE 84	5,258 Aa	4,875 Ba	0,649 Ca	0,725 Ca	1,580 Da
SE 106	4,765 Ab	4,126 Ba	0,854 Ca	0,836 Ca	1,317 Da

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

\* Resultados em  $\log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>

## Discussão

Segundo Cerca (2012) e Wang et al. (2013), ainda poucos estudos avaliam a capacidade de formação de biofilme com várias estirpes do mesmo microrganismo, e mais limitados são os dados de pesquisa disponíveis sobre a produção de biofilme por diferentes cepas do mesmo patógeno em diferentes condições ambientais.

Ao comparar as duas estirpes de *Salmonella* Enteritidis isoladas do ambiente avícola, a SE 84 isolada de peito de frango e não envolvida em surto de DTA, formou mais biofilme quando comparada com a SE 106, isolada de swab de arrasto de ambientes de frangos de corte.

Segundo Ronner and Wong (1993), para caracterizar a formação de biofilme são necessários um número mínimo  $10^3$  UFC ( $3 \log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>) e  $10^5$  UFC ( $5 \log^{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>)

aderidas por cm<sup>2</sup>. Sendo assim, ambas as cepas estudadas formaram biofilmes em todas as temperaturas avaliadas.

Ao analisarem as mesmas amostras, Silva et al. (2014) identificaram que a SE 106 se revelou multirresistente a antibióticos, sendo resistente a três princípios ativos, Eritromicina, Neomicina e Sulfonamidas. Já a SE 84 não foi multirresistente.

Silva (2014), avaliou os genes de virulência presentes nas duas *Salmonella* Enteritidis usadas em nossa pesquisa, e somente a SE 84 possuía o gene *spiA* em seu perfil genético, que está envolvido na formação de biofilmes e também na virulência da *Salmonella* Enteritidis (Dong et al. 2011). Confirmam nossos achados, mostrando evidências para a SE 84 ter formado mais biofilme.

Frente a isso é importante ressaltar que existe a questão da ação da própria cepa a ser avaliada, e não a origem em si. Outros trabalhos relatam que essa diferença que encontramos é devido à variabilidade da cepa. Lianou & Koutsoumanis (2012), Wang et al. (2013), Vestby et al. (2009), relatam diferenças significativas entre os sorovares de *Salmonella* spp. sobre a capacidade de formar biofilme. Além disso, observaram que a variabilidade das estirpes na formação do biofilme é afetada por todos os parâmetros ambientais testados, e pareceu aumentar a formação do biofilme à medida que as condições tornaram-se menos favoráveis para o microrganismo.

Esta particularidade de cada estirpe é importante para a sobrevivência da bactéria em ambientes de processamento de alimentos. Com isso os resultados deste estudo fornecem informações úteis para o avanço da compreensão da variabilidade na dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis, bem como na seleção de cepas para a avaliação da eficácia dos procedimentos de higienização contra esta formação.

Os abatedouros avícolas brasileiros que exportam seus produtos para a União Europeia (EU) devem garantir temperatura ambiente não superior a 10°C na sala de cortes. O

resfriamento dos produtos de aves deve ser a uma temperatura de no máximo 4°C, respeitando, assim, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves, conforme a Portaria nº 210 (Brasil 1998).

Partindo deste pressuposto, nesse experimento foram mimetizadas as temperaturas preconizadas em abatedouros avícolas: 3±1°C (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C); 9±1°C (temperatura da sala de cortes para UE, máximo 10°C); 25±1°C (temperatura ambiente); 36±1°C (padrão ótimo para crescimento de mesófilos) e 42°C±1°C (temperatura de enriquecimento seletivo para *Salmonella*, devido à termotolerância).

Até onde sabemos, esta é a primeira publicação sobre a formação de biofilmes por *S. Enteritidis* na temperatura de 3°C nestas superfícies. Ressaltamos que esta temperatura não foi até então descrita como propícia para o desenvolvimento de *Salmonella* spp.. Obtivemos resultados inéditos frente às diferentes temperaturas utilizadas para incubação, com mesma formação de biofilmes em temperaturas de conservação de alimentos (3°C e 9°C) e temperaturas ótimas de crescimento (36°C), independente da superfície.

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 and Singh (2012) salientam que já está bem documentado que a *Salmonella* não cresce entre 4°C e 8°C. Além disso, o programa de modelagem de patógenos do United States Department of Agriculture (USDA) versão 6.1, oferece a temperatura de 5°C como a menor temperatura possível para o crescimento de *Salmonella* spp.

Os resultados encontrados foram semelhantes aos obtidos na superfície de poliestireno por Rodrigues et al., descritos em artigo submetido para publicação (comunicação pessoal), que analisaram a habilidade de formação de biofilmes em 170 amostras de *Salmonella* Enteritidis, e todas foram capazes de formar biofilme em temperaturas de refrigeração (3°C). Este relato também é corroborado por Morey and Singh (2012), que salientam que temperaturas

baixas, 4°C e 8°C, foram fatores importantes na determinação da sobrevivência e crescimento de *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*.

Como citado por Reuter et al. (2010) e Rode et al. (2007), os microrganismos na forma de vida séssil adaptam-se melhor ao meio, e isso permite a sobrevivência e crescimento sob condições prejudiciais e estressantes. Resultados semelhantes são reportados em nosso estudo que, em condições inóspitas como temperaturas baixas e de termotolerância, a *S. Enteritidis* formou biofilme.

Em alimentos como a carne de frango, onde diversas intervenções tentam reduzir os agentes patogênicos, mais investigações são necessárias para proporcionar uma temperatura ótima de refrigeração que realmente iniba o crescimento da *Salmonella*. Já que são escassos os dados sobre crescimento em baixas temperaturas, nossos resultados podem auxiliar na conservação do produto, na sua vida de prateleira e, conseqüentemente, terá reflexos na saúde pública.

Além da preocupação com o armazenamento correto do produto, Contreras et al. (2003) afirma que toda planta de uma indústria alimentícia deve ser limpa e sanificada após o término do processo produtivo, realizado no final do turno de abate e denominada higiene pré-operacional. Durante o dia, é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização durante intervalos na produção.

O procedimento de higienização nos matadouros de aves consiste fundamentalmente no processo de esfrega através de ação mecânica para remoção de resíduos sólidos, uso de água quente a 45°C com aproximadamente 22,5 bar de pressão no enxague, e o uso de detergentes e sanificantes, como o ácido peracético e amônia quaternária. A sanitização é a última etapa do processo de higienização, seu objetivo é reduzir microrganismos alteradores e eliminar patógenos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade

higiênico-sanitária (Moraes et al. 1997). Para higiene operacional de utensílios, como facas de corte, é utilizada água quente a 85°C por no mínimo 3 minutos (Brasil 1998).

Quando avaliamos os resultados entre os diferentes tratamentos utilizados para remoção do biofilme, o uso do ácido peracético e da água aquecida a 85°C reduziram com a mesma eficácia os biofilmes formados por SE em todas as temperaturas e tempos de formação, seguido pela ação da amônia quaternária.

Segundo Vialtra et al. (2012), a eficiência da operação de higienização de um equipamento ou superfície é medida pela quantidade de microrganismos viáveis aderidos após essa operação e, de maneira geral, os equipamentos e utensílios não devem conter mais do que 100 UFC.cm<sup>-2</sup>. Na Diretiva 471/2001 da UE, no teste de superfícies, o nível aceitável é até no máximo 10 UFC.cm<sup>-2</sup> de microrganismos mesófilos e 1 UFC.cm<sup>-2</sup> de enterobactérias. Os estabelecimentos habilitados à exportação para a União Europeia devem atender a esta diretiva (União Europeia 2001a).

Conforme recomendações da *American Public Health Association* (APHA 2014), para que as superfícies sejam consideradas higienizadas os sanitizantes físicos ou químicos devem reduzir em até 2 UFC.cm<sup>-2</sup> o número de microrganismos das superfícies. Em superfícies aderidas, de acordo com a norma EN 13697:2001 do teste de superfícies da União Europeia, deve representar uma redução de no mínimo 4 log (Moretro et al, 2009; União Europeia 2001b).

Obtivemos uma redução de 4,23 log<sub>10</sub>UFC.mL<sup>-1</sup> com 5 minutos de contato com o ácido peracético, e a amônia quaternária reduziu 3,562 log<sub>10</sub>UFC.mL<sup>-1</sup>. A água aquecida a 85°C com 3 minutos de contato reduziu 4,26 log<sub>10</sub>UFC.mL<sup>-1</sup>. Já a água aquecida a 45°C não atendeu as recomendações para higienização correta de uma superfície, com redução de somente 0,511 log<sub>10</sub>UFC.mL<sup>-1</sup>. Esses relatos são reforçados por Kich et al. (2004), obtiveram

um redução de 4 log do patógeno *S. Typhimurium* em 15 minutos de contanto com o sanitizante ácido peracético.

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-enxague.

Em suas pesquisas Silva et al. (2014) e Sinde & Carballo (2000), confirmam a eficácia dos sanitizantes frente a SE e que a redução da aderência dependeu das propriedades do material testado. Já Borowsky et al. (2006) referem a resistência de amostras de *S. Typhimurium* em 5 minutos de exposição aos sanitizantes, no entanto em 15 minutos de contanto nenhuma foi resistente.

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 envolvido em sua resistência a desinfetantes é crucial para o seu controle.

Estudos revisados por Bridiera et al. (2011), evidenciam que a resistência do biofilme a um desinfetante é intimamente relacionada com a sua estrutura tridimensional, com a bioestrutura heterogênea e multifatorial, resultado de uma acumulação de diferentes mecanismos. Em vista do observado sobre a resistência de biofilmes a desinfetantes, é fundamental que se leve em conta o “modo de vida” dos biofilmes, já que incidem sobre a avaliação da eficácia de um desinfetante.

Frente aos resultados obtidos em nosso estudo, a melhor opção para a remoção de biofilmes de SE, em superfícies usadas comumente em abatedouros, é a utilização de ácido peracético como agente sanitizante e o uso da água aquecida a 85°C para os utensílios, apresentando-se ainda como uma boa segunda opção o uso de amônia quaternária.

Além disso, esses resultados salientam a necessidade de emprego de ação mecânica em conjunto à ação química na remoção dos biofilmes. Os resultados demonstraram a importância dos procedimentos de higiene nas superfícies que entram em contato com os alimentos, já que se verificou que a formação de biofilme pode ocorrer mesmo em um curto período de tempo, o que enfatiza a necessidade de bons procedimentos de limpeza durante todo o processamento de alimentos.

A aderência de microrganismos a uma superfície está intimamente relacionada com as propriedades do material testado. No processo de fabricação de alimentos vários tipos de superfícies são utilizadas, como o aço inoxidável e os polímeros, que sofrem desgastes com o uso repetido e aumentam a possibilidade do acúmulo de sujidades e bactérias (Holah & Thorpe 1990; Sinde & Carballo 2000, Steenackers *et al.* 2012; Stepanovic *et al.* 2004).

Dentre os materiais mais utilizados o aço inoxidável tem sido o material de escolha por ter uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado com a ampla variedade de polímeros. Porém sua aplicabilidade é limitada em locais que são necessários materiais flexíveis (Holah & Thorpe 1990; Rossoni & Gaylarde 2000). Para o processamento de alimentos, principalmente em abatedouros de frangos de corte, também se destacam as esteira de poliuretano e os utensílios fabricados com polietileno, principalmente placas de corte (Carpentier 1997; Rodrigues *et al.* 2013; Steenackers *et al.* 2012).

Observa-se formação de biofilmes na superfície de polietileno, por ser uma superfície de natureza polimérica com maior manipulação. Sinde & Carballo (2000) afirmam que as placas de corte de polietileno apresentam superfícies irregulares, o que facilita a deposição de material orgânico dificultando a ação dos agentes desinfetantes. Em contrapartida, o polietileno é muito usado por ser atóxico e proporcionar menor desgaste das facas de corte.

No aço inoxidável e no poliuretano também houve formação de biofilmes. Por serem superfícies menos irregulares, demonstram uma maior adequação desses materiais na

indústria de alimentos e frente a processos de higienização. Porém, o uso do aço inoxidável fica limitado devido ao alto custo e a pouca flexibilidade do material. Preocupa-se com o crescimento de biofilme no aço inoxidável a 3°C, ambiente encontrado no chiller de abatedouros de aves. Oliveira et al. (2006), sugerem que não é a distância entre as rugosidades que abriga as células, e sim a profundidade dessas imperfeições, que leva a uma maior adesão microbiana.

Em consonância com esta citação, Kusumaningrum et al. (2003) recuperaram *S. Enteritidis* a partir da superfície de aço inoxidável em experimento mantido por quatro dias, com níveis elevados de contaminação. O'Leary et al. (2012), estudaram a formação de biofilme por cepas de *Salmonella* Typhimurium em superfície de aço inoxidável e plástico PVC e verificaram que a maioria das estirpes possuíam capacidade de formação de biofilme altamente dependente da superfície de adesão.

Já Parizzi et al. (2004) salientaram que o número de células aderidas nas superfícies aumentou com o tempo de contato do microrganismo. Ao avaliar a formação de biofilme na superfície de poliestireno por *S. Heidelberg*, Rodrigues et al. (2009), observaram que todas as amostras foram capazes de formar biofilme.

Em 2013, Rodrigues et al. (2013), avaliaram a adesão de microrganismos patogênicos nas superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polietileno no processo de higiene pré-operacional em sala de cortes em um abatedouro de aves. Somente foi isolado microrganismos do poliuretano e da mesa de aço inoxidável, antes da lavagem, não obtendo achados na superfície de polietileno.

Stepanovic et al. (2004), observou a formação de biofilme por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em superfície de plástico, e em todos os testes ambos microrganismos produziram biofilme estando em um meio adequado. Ao observar o meio de crescimento, a *Salmonella* spp. produziu mais biofilme em meio mais limitado em nutrientes, enfatizando o

uso do TSB sem glicose na nossa pesquisa. Rodrigues et al (2009), corroboram a capacidade de desenvolvimento biofilme por *Salmonella* spp. em ambiente sem glicose.

De maneira geral, os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que tanto no aço inoxidável, quanto no poliuretano e polietileno, materiais amplamente utilizados na indústria de alimentos, propiciaram a aderência de ambos os sorovares de *S. Enteritidis*. Enfatiza-se a formação de biofilme em baixas temperaturas e curto período de contato, propiciando contagens expressivas, que possibilitam a potencial contaminação cruzada durante o processamento de alimentos.

### **Acknowledgements**

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.

### **References**

APHA: American Public Health Association [Internet]. 2014. [cited 2015 mai 14]. Available from: <http://www.apha.org/>.

Borowsky LM, Bessa MC, Cardoso MI, Avancini CAM. 2006. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. *Ciência Rural*. 36:76-79.

- Brasil: Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. Diário Oficial da União de 05 de março. 1999, seção 1, p. 17.
- Bressler DC, Balzer M, Dannehl A, Flemming HC, Wingender J. 2009. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. *Water Science and Technology*. 9:81–87.
- Bridiera A, Briandeta R, Thomas V, Dubois-Brissonneta F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 27:1017–1032.
- Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM, Kanashiro AMI. 2000. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. *Arquivos do Instituto Biológico*. 67(1).
- Careli RT. 2005. Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos. 81 f. Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa.
- Carpentier B. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. 1997. *Food Microbiology*. 14:31-37.
- CDC: Center for Disease Control. CDC and Food Safety. [Internet]. 2014a. [cited 2015 jun 3] Available from: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>>.
- CDC: Center for Disease Control. Making Food Safer to Eat: Reducing contamination from the farm to the table. [Internet]. 2013. [cited 2015 jun 3] Available from: <<http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/>>.
- Cerca N. 2012. Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria. Porto: Publindústria, Edições Técnicas.

- Contreras CJ, Bromberg R, Cipolli KMVAB, Miyagusku L. 2003. Higiene e Sanitização na indústria de carnes e derivados. São Paulo: Varela, p. 180.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilmes. *Annual Review of Microbiology*. 49:711-745.
- Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S, Liu X. 2011. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. *Microbiology*. 157:1798-1805.
- Fuster-Valls N. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 19:308-314.
- Gast RK. 2008. *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. pp 636-665.
- Gibson H. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 87:41-48.
- Holah JT, Thorpe RH. 1990. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology*. 69:599-608.
- ISO 18593:2012. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. p.8.
- Joseph B, Otta SK, Karunasagar I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 64:367-372.
- Kich JD, Borowsky LM, Silva VS, Ramenzoni M, Triques N, Kooler FL, Cardoso MRI. 2004. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a

- amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32:33-39.
- Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 83:227-236.
- Lianou A, Koutsoumanis KP. 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 160:171–178.
- Lima ESC, Pinto PSA, Santos JL, Vanetti MCD, Bevilacqua PD, Almeida LP, Pinto MS, Dias FS. 2004. Isolation of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* at swine slaughtering as subsidy for HACCP, the Hazard analysis and critical control point system. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24:185-190.
- Manijeh M, Mohammad J, Roha KK. 2008. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. *Journal of Biological Science*. 8:502-505.
- Miljkovic-Selimovic B, Babic T, Stojanovic P. 2010. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis – actualities and importance. *Acta Medica Medianae*. 49(3).
- Moraes MSV, Andrade NJ, Chaves JBP, Passos FJV, Gomide LAM. 1997. Isolament of aerobic mesophilic and thermophilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. *Food Science and Technology*. 17: 325-329.
- Moretro T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry T. *Journal of Applied Microbiology*. 106:1005–1012
- Morey A, Singh S. 2012. Low-Temperature Survival of *Salmonella* spp. in a Model Food System with Natural Microflora. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9:218-223.

- O'Leary D, McCabe EM, McCusker MP, Martins M, Fanning S, Duffy G. 2013. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. *International Journal of Food Microbiology*. 161:36-43.
- Oliveira FA, Brandelli A, Tondo EC. 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *The New Microbiologica*. 29:49-54.
- Parizzi SQF, Andrade NJ, Silva CAS, Soares NFF, Silva EAM. 2004. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47:77-83.
- Programa de vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos: VEDTA. 2013. Programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos Divisão de Vigilância Epidemiológica/RS- Secretaria da Saúde do Estado.
- Reuter M, Mallett A, Pearson BM, van Vliet AH. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:2122-2128.
- Rode TM, Langsrud S, Holck A, Moretro T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 116:372-383.
- Rodrigues LR, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, Rodegheri SC, Taglieti RM, Dickel EL, Nascimento VP. 2009. Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37:225-230.
- Rodrigues LR, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Trenhago G, Oliveira AP, Ferreira D, Pilotto F, Nascimento VP. 2013. *Salmonella* and *Listeria* from Stainless Steel,

Polyurethane and Polyethylene Surfaces in the Cutting Room of a Poultry Slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinariae*. 41:1-7.

Rodrigues LB, Santos LR, Pilotto F, Silva CF, Gehlen SS, Diedrich LN, Tondo EC, Nascimento VP. Biofilm formation at different incubation temperatures by *Salmonella* Enteritidis. Artigo submetido para publicação (comunicação pessoal).

Ronner AB, Wong ACL. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and buna-n rubber. *Journal of Food Protection*. 56:750-758.

Rossoni EMM, Gaylarde CC. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*. 61:81-85.

Scherba G, Eigel RM, O'Brien WD. 1991. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:2079-2084.

Silva CF. 2014. Padrão de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilme. Passo Fundo, 90f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação)-Curso de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo.

Silva CF, Gehlen SS, Webber B, Diedrich LN, Pilotto F, Santos LR, Tondo EC, Nascimento VP, Rodrigues LB. 2014. Biofilm Former *Salmonella* Enteritidis are Multiresistant to Antibiotics. *Acta Scientiae Veterinariae*. 42:1229.

Silva FAS. ASSISTAT: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG – Atualizado em 01 de abril de 2014. [Internet]. [cited 2015 fev 10]. Available from: <[www.assistat.com](http://www.assistat.com)>.

Sinde E, Carballo J. 2000. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*. 17:439-447.

- Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 45(2): 502–531.
- Stepanovic S, Irkovic IC, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 38:428–432.
- Tortora GR. 2012. *Microbiologia*. 10<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed.
- UNIÃO EUROPÉIA. Directiva 2001/471/CE de 21 de junho de 2001. Regras para os controles regulares à higiene geral dos estabelecimentos. Comissão da Comunidades Européias, Europa, 2001a.
- UNIÃO EUROPÉIA. NS-EN 13697:2001: Quantitative Non-Porous Surface Test for the Evaluation of Bactericidal and/or Fungicidal Activity of Chemical Disinfectants used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas. Test Method and equirements without Mechanical Action. Brussels, Belgium: European Committee for standardization. Europa, 2001b.
- USDA: United States Department of Agriculture. [Internet]. 2012. Food Safety and Inspection Service. Standards for *Salmonella* and *Campylobacter* in chilled carcasses at young chicken and turkey slaughter establishments. Washington, DC. [cited 2013 mai 2]. Available from: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISNotices/54-12.pdf/>
- Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*. 5:20.
- Vialta A, Moreno I, Valle JLE. 2002. Boas Práticas de Fabricação, Higienização e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Indústria de Laticínios: 1-Requeijão. *Indústria de Laticínios*. 37:56-63.

Wang HH, Ye KP, Zhang QQ, Dong Y, Xu XL, Zhou GH. 2013. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Control*. 32:650-658.

WHO: World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. [Internet]. 2011. [cited 2014 mar 5]. Available from:<<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo da capacidade dessas *Salmonella* Enteritidis aderir e formar biofilme em superfícies comumente usadas na indústria de alimentos, assim como a resistência aos sanitizantes e processos de higienização, é de grande relevância tanto para as indústrias de alimentos quanto para a saúde pública. A contaminação de seres humanos pode estar diretamente ligada à formação de biofilme nessas superfícies, ocasionando contaminação do alimento. Neste sentido, com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) Não houve diferença estatística entre o uso do vórtex e da sonicação na remoção de biofilmes. Porém, o uso do ultrassom, com frequência de 40 kHz por 10 min., foi determinado como padrão para a desadesão dos biofilmes formados *in vitro*, devido à maior remoção, facilidade de uso e às suas propriedades hidrodinâmicas que desestabilizam a estrutura do biofilme.
- b) As *S. Enteritidis* foram capazes de formar biofilmes em todas as condições ambientais avaliadas de temperaturas (3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C) e superfícies (polietileno, aço inoxidável e poliuretano).
- c) Houve formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis* na temperatura de 3°C nas superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável. Até onde sabemos esta temperatura não foi até então descrita como propícia para o desenvolvimento de *Salmonella* spp. nestas superfícies.
- d) 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).
- e) A remoção de biofilmes formados pelas SE nas diferentes superfícies foi estatisticamente mais eficaz com o uso de ácido peracético como sanitizante, e semelhante ao uso da água aquecida a 85°C.
- f) A higienização na superfície de polietileno foi menor quando comparada no poliuretano e no aço inoxidável, por ser de natureza polimérica e com maior manipulação, podem apresentar irregularidades que dificultam a ação dos agentes desinfetantes.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes resultados denotam grande relevância devido à possibilidade de permanência destas *Salmonella* Enteritidis em ambientes de manipulação de alimentos na forma de biofilmes, e apresentarem resistência a sanitizantes usados na remoção em procedimentos de higienização comumente usados nas indústrias de alimentos. Nossos resultados impulsionam estratégias de controle de biofilmes e auxiliam a indústria avícola a aprimorar as condições higiênicas destes estabelecimentos.

Estudos futuros são necessários para desenvolver estratégias no controle de formação de biofilmes. Projetos já estão sendo desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa com isolamentos de bacteriófagos para posterior aplicação em biofilmes. Além disso, terapêuticas que usem o sistema QS (quorum sensing) como alvo no controle de formação de biofilmes também será avaliado.

A microtopografia das superfícies, polietileno, poliuretano e aço inoxidável, com o biofilme formado, será avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) posteriormente. Os cupons estão armazenados já fixados em glutaraldeído.

Como perspectivas futuras deste trabalho estão os testes com outras duas cepas de *Salmonella* Enteritidis, oriundas de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), quanto à formação de biofilme mono-espécie em aço inoxidável, polietileno e poliuretano e sensibilidade destes biofilmes frente à água quente, amônia quaternária e ácido peracético. A partir desses resultados, poderá ser comparada a variabilidade entre essas cepas, de fonte avícola e de surtos de DTA, frente a todas as condições ambientais testadas.

Alem disso será realizada a detecção, por biossensores, de moléculas sinalizadoras do quórum sensing e a verificação da formação de biofilmes multiespécies por estas mesmas amostras juntamente com amostras de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em aço inoxidável, polietileno e poliuretano e sua sensibilidade frente a tratamentos com água quente, amônia quaternária e ácido peracético.

## 7. REFERÊNCIAS

1. UBABEF - União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2013. [capturado 03 mar. 2015] Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>
2. ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2014. [capturado 03 mar. 2015] Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicações/8ca705e70f0cb110aed67d29c8842.pdf>
3. Furlan RL. Anatomia - Fisiologia. In: Berchieri JrA, Macari M. Doenças das aves. Campinas: Facta, 2000. p.13-28.
4. Programa de vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos – VEDTA. Relatório 2013. Divisão de Vigilância Epidemiológica/RS- Secretaria da Saúde do Estado.
5. Borsoi A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. Ciência Rural. 2010; Nov.; 40 Suppl 11:2338-2342.
6. WHO - World Health Organization. Global NetworkGlobal Foodborne Infections Network. Global Salm Surv. [capturado 05 abr. 2015] Disponível em: [http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY\\_DATA\\_SET\\_REP.show\\_parms](http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_parms)
7. Fuster-Valls N, Hernández-Herrero M, Marín-de-Mateo M, Rodríguez-Jerez JJ. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. Food Control. 2008; 19 Suppl 3:308-314.
8. Manijeh M, Mohammad J, Roha KK. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. Journal of Biological Science. 2008; 8(2):502-505.
9. Jong HK, Parry CM, Poll TVD, Wiersinga WJ. Host-pathogen interactions in invasive Salmonellosis. PLOS Pathogens. 2010; 8(10):1-9.
10. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre, Brazil: Artmed, p.410; 2002.
11. Grimont P, Weil F. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: World Health Organization. 9th edn Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur Paris. Paris: 2007. p.6-7.
12. Vieira AR, *et al.* A resource to link human and non-human sources of Salmonella. WHO Global Foodborne Infections Network Country Databank. In: ISVEE Conference. Durban, South Africa: 2009.

13. WHO - World Health Organization. Global NetworkGlobal Foodborne Infections Network. Global Salm Surv. [capturado 08 abr. 2015] Disponível em: [http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY\\_DATA\\_SET\\_REP.show\\_parms](http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_parms)
14. WHO - World Health Organization. Global NetworkGlobal Foodborne Infections Network. May 2011 Vol IV. [capturado 10 mar. 2015] Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/GFN\\_update\\_may\\_2011.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/GFN_update_may_2011.pdf?ua=1)
15. WHO - World Health Organization-*Salmonella*. [capturado 03 jan. 2014] Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>
16. Rodrigues D. Perspectivas atuais e falhas no diagnostico antigênico de *Salmonella* spp: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. *In*: Anais “Seminario internacional sobre Salmonellosis aviar”. ALA-UBABEF. Rio de Janeiro: Jun 2011. p.28-30.
17. CDC – Centers for Disease Control and Prevention. [capturado 15 jul. 2014] Disponível em: [http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella\\_enteritidis](http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis)
18. CDC - Center for Disease Control. Making Food Safer to Eat: Reducing contamination from the farm to the table. [capturado 18 mar. 2013] Disponível em: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety>
19. CDC - Center for Disease Control. *Salmonella*. 2014b. [capturado 17 mar. 2014] Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/>
20. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Dados epidemiológicos – DTA – período de 2001 a 2011. [capturado 25 fev. 2013] Disponível em: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)
21. Hald T, Vose D, Wegener HC, Koupeev T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 2004. (24): 225-269.
22. Schlundt J, Toyofuku H, Jansen J, Herbst SA. Emerging food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Technol.* 2004; (23): 513-533.
23. BRASIL - Ministério da Agricultura - Portaria SDA. N.126, de 06 de novembro de 1995; Diário Oficial da União, Brasília, DF. MAA. Normas para diagnóstico das Salmoneloses aviárias.
24. BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. Diário Oficial da União de 10 out. 2003; seção 1; p. 9.
25. Miljkovic-Selimovic B, Babic T, Stojanovic P. *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis – actualities and importance. *Acta Medica Medianae.* 2010; 49(3).

26. Robinsom S. The Big Five: Most Common Salmonella Strains in Foodborne Illness Outbreaks. Food Safety News. [capturado 03 jan. 2014] Disponível em: <http://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-salmonella-strains/#.UsbJ5dJDunI>
27. Foley SL, Lynne AM. Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. Journal of Animal Science. 2008; 86(14):173-187.
28. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Brasília, DF, 2008; 186p.
29. Peresi JTM, Lima IAZC, Tavechio AT, Fernandes SA, Gelli DS. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes microbianos de cepas isoladas 390 de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 1999; 58(1):41-6.
30. Gal-mor O. *Salmonella enterica*. The Infectious Disease Research Laboratory – Sheba Medical Center, Israel. [capturado 05 dez. 2014] Disponível em: <http://eng.sheba.co.il>
31. Bäumlér AJ, Gilde AJ, Tsois RM, Van der Velden WM, Ahmer BMM, Heffron F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operon during evolution of *Salmonella* serotypes. Journal of Bacteriology. 1997; 179(2):317-322.
32. Cerca N. Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria. Porto:Publindústria, Edições Técnicas. 2012.
33. Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM, Kanashiro AMI. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. Arquivos do Instituto Biológico. 2000; on-line 67(1).
34. Caixeta DS. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. [monografia]. Mestrado em Microbiologia Agrícola. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2008.
35. Zobell CE. The effects of solids surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriology. 1943; (46): 39-56.
36. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilmes. Annual Review of Microbiology. 1995; (49):711-745.
37. Donlan RM, Costerton JW. Biofilmes: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(2):167-193.
38. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilmes: A Common Cause of Persistent Infections. Science. 1999; (284): 1318-1322.

39. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2000; p. 827.
40. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. 2001; 147:3-9.
41. Elvers KE, Lappin-Scott HM. Biofilms and biofouling. Encyclop of Microbiol. 2000; 1:478-485.
42. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. Adv Dent Res. 1997; 11:160-167.
43. Sauer K, Camper AK, Erchlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol. 2002; 184:1140-1154.
44. Richard HA, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. BACTERIAL COAGGREGATION: An integral process in the development of multi-species biofilms. Trends in Microbiology. 2003; London. 11(2):94-99.
45. Marques CS. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. [monografia]. Mestrado em Microbiologia Ciência e Tecnologia de Alimentos. Lavras: Universidade Federal de Lavras - UFLA; 2005.
46. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. Biotechnol Bioeng. 1994; 43:1131-1138.
47. Notermans S, Dormans JAMA, Mead GC. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: A review. Biofouling. 1991; 5:1-16.
48. Characklis WG. Biofilm development: A process analysis. In Microbial Adhesion and Aggregation. 1984; Ed. K. C. Marshall, Sprig Verlag, New York.
49. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review International Journal of Food Microbiology. Amsterdam. Jun 1998; 42(1/2):9-27.
50. Fuster-valls N, Marín-de-Mateo M, Rodriguez-Jerez J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. Food Control. 2008; 19(3):308-314.
51. Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. Internat Biodeterior and Biodegrad. 2003; 51:249-253.
52. Manijeh M, Mohammad J, Roha KK. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. Journal of Biological Science. 2008; 8(2):502-505.

53. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*. 2002; 43(3):793-808.
54. Morelli AMF. *Escherichia coli* 0157:H7: ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes. [monografia]. Mestrado em Microbiologia Ciência e Tecnologia de Alimentos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – UFV; 2008.
55. Lindsay D, Holy AV. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*. 1997; 14, 383–390.
56. Parizzi SQF, Andrare NJ, Silva CAS, Soares NFF, Silva EAM. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004; 47:77-83.
57. Mason TJ, Duckhouse H, Joyce E, Lorimer JP. Uses of ultrasound in the biological decontamination of water. WCU. Paris, Set. 2003; 7-10.
58. Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre, 6 ed.: Artmed. 2005. p.711.
59. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos. 2008. [capturado 11 jul. 2014] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf>
60. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JJG. *Bacteriophage therapy*. *Antim Agents and Chemother* 2001; 45:649-659.
61. McKenna F, El-Tarabily KA, Hardy GEST, Dell B. Novel in vivo use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces* scabies-infected seed potatoes. *Plant Pathol*. 2001; 50:666-675.
62. Manual e Higienização indústria alimentar. [capturado 11 fev. 2014] Disponível em: [www.esac.pt/noronha/manuais/Manual\\_higienizao\\_aesbuc.pdf](http://www.esac.pt/noronha/manuais/Manual_higienizao_aesbuc.pdf)
63. Holah JT, Thorpe RH. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology*. 1990; Inglaterra 69(4):599-608.
64. Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International journal of food microbiology*. 2000; 61:81-85.
65. Carpentier B. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiology*. 1997; França. 14:31-37.
66. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*. 2000; 17(4): 439-447.

67. Contreras CJ, Bromberg R, Cipolli KMVAB, Miyagusku L. Higiene e Sanitização na indústria de carnes e derivados. São Paulo: Varela; 2003; p.180.
68. Moraes MSV. Isolament of aerobic mesofilic and thermofilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1997; 17(3):325-329.
69. Andrade NJ. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela. 2008; p.412.
70. CNI/SENAI/SEBRAE Elementos de apoio para o sistema APPCC. Brasília, SENAI/ND. Série Qualidade Alimentar. 1999; p.371.
71. Mcdonell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology.* 1999; 12:147-179.
72. Frazier WC. *Microbiologia de los Alimentos.* Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia. Food microbiology. 1972.
73. Romão CMCA. Desinfecção e esterilização química. In: Teixeira P, Valle S. (Org). *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996; 133-162.
74. Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. *In: Block SS Disinfection, sterilization and preservation.* 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1991; p.225-253.
75. BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa n° 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. *Diário Oficial da União* de 05 de março. 1999; 1:17.
76. Morey A, Singh S. Low-Temperature Survival of Salmonella spp. in a Model Food System with Natural Microflora. Department of Poultry Science, Auburn University, Auburn, Alabama. *Foodborne pathogens and disease.* 2010; 9(3). DOI: 10.1089/fpd.2011.1016
77. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews.* 2000; 24:661-671.