PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Salmonella* ISOLADAS DE PRODUTOS DE FRANGO, SUÍNO E BOVINO

LEAL, M.C.G.M.*[1]; DIAS, P.A.[2]; ZONTA, M.N.[3]; TIMM, C.D.[2]

INTRODUÇÃO

Registros epidemiológicos ressaltam a importância da *Salmonella* como uma das principais causas de doença bacteriana alimentar em humanos (D' AOUST et al., 2001). Inúmeros surtos de toxinfecção alimentar causados por essa bactéria são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos. Verifica-se, no entanto, que carnes de aves e de outras espécies estão freqüentemente implicadas (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

A presença de microrganismos formadores de biofilmes nas indústrias de alimentos, como *Salmonella*, é motivo de preocupação por parte dos órgãos responsáveis pela inspeção de produtos de origem animal e saúde pública, uma vez que bactérias oriundas de biofilmes podem apresentar resistência aumentada frente a agentes antimicrobianos, quando comparadas a bactérias planctônicas (JOSEPH et al., 2001).

A ocorrência de falhas no processo de higienização permite que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação na indústria de alimentos. Os microrganismos podem aderir às superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando a multiplicação celular (OLIVEIRA et. al., 2006). Quando a massa bacteriana é suficientemente espessa para agregar nutrientes, resíduos e outros organismos, o biofilme está estabelecido (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994).

O trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de diferentes cepas de *Salmonella* isoladas de produtos cárneos formarem biofilme.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezessete isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* do banco de cepas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas, previamente isolados de produtos cárneos (Tabela 1), foram recuperados em caldo Tripticase de Soja (TSB, Acumedia, Lansing, Michigan, USA) e utilizados para avaliar a capacidade de produção de biofilme em placa de microtitulação com fundo chato (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), conforme técnica descrita por MØRETRØ et al. (2003).

[1] Acadêmica de Medicina Veterinária - UFPel
[2] Professores de Inspeção de Leite e Derivados - UFPel
[3] Residente em Medicina Veterinária - UFPel
Autor para contato: Cláudio Dias Timm
Endereço: Inspeção de Leite e Derivados, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus universitário, prédio 34, Pelotas, RS, CEP: 96010-900.
E-mail: inspleit@ufpel.tche.br

Tabela 1. Isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* utilizados no experimento.

Identificação	Sorotipo	Fonte
LIPOA 2001	Enteritidis	carne de frango moída
LIPOA 2002	Enteritidis	carne de frango moída
LIPOA 2003	Enteritidis	carne de frango moída
LIPOA 2004	Agona	salsichão de frango
LIPOA 2005	Infantis	lingüiça seca de suíno
LIPOA 2006	Enteritidis	carne de frango moída
LIPOA 2007	Derby	carne de frango moída
LIPOA 2008	Enteritidis	carne de frango moída
LIPOA 2009	Havana	lingüiça frescal de suíno
LIPOA 2011	Infantis	lingüiça seca de suíno
LIPOA 2023	Typhimurium	salsichão de suíno
LIPOA 2034	Muenchen	carne bovina moída
LIPOA 2035	Derby	carne bovina moída
LIPOA 2039	Infantis	carne bovina moída
LIPOA 2040	Anatum	chuleta de suíno
LIPOA 2042	Derby	chuleta de suíno
LIPOA 2043	Newport	coxa/sobrecoxa de frango

Culturas *overnight* a 37°C dos isolados em TSB foram diluídas a 1:100 em TSB. Alíquotas de 200 µL da suspensão de células de cada isolado foram distribuídas nas cavidades da placa e incubadas a 37°C por 24 horas. A placa foi, então, lavada três vezes com 200 µL de água peptonada 0,1% (m/v) para remoção das células que não aderiram e seca por inversão. As células aderidas na placa foram coradas com 100 µL de solução cristal violeta (cristal violeta 2,4 g, álcool etílico 95% 60 mL, fenol fundido 6 mL, água destilada 600 mL) por 3 minutos. O corante foi removido e, após secagem por 2 horas, a absorbância a 492 nm foi determinada em leitor de ELISA. Os isolados que apresentaram $A_{492} < 0,2$, $0,2 = A_{492} < 1,0$ e $A_{492} = 1,0$ foram definidos como não formadores, fracos formadores e forte formadores de biofilme, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois isolados de *Salmonella* (11,8%), sorotipos Infantis (isolado de carne bovina moída) e Newport (obtido de coxa/sobrecoxa de frango), foram definidos como fracos formadores de biofilme, apresentando $A_{492} = 0,387$ e 0,325, respectivamente. Os demais sorotipos utilizados no experimento apresentaram resultados com $A_{492} < 0,2$ e foram considerados como não formadores de biofilme.

JOSEPH et al. (2005) testaram a capacidade de *Salmonella* isoladas de carne de aves formarem biofilmes em três tipos diferentes de superfícies (plástico, cimento e aço), confirmando a capacidade de formação de biofilme pela bactéria. Entretanto, esses autores trabalharam com uma cepa do sorotipo Weltrevedren e outra não sorotipada. No presente estudo, embora não tenha sido utilizado o sorotipo Weltrevedren, foram testados nove diferentes sorotipos isolados de produtos cárneos de três espécies animais.

De acordo com FLACH et al. (2005), existem vários fatores relacionados à formação de biofilmes. Os principais são: características físico-químicas da superfície, expressão de fatores de virulência por parte dos microrganismos e estado fisiológico das células bacterianas no momento da análise. É possível que as placas de microtitulação utilizadas neste estudo estejam relacionadas com a fraca capacidade de formação de biofilme observada nos isolados que apresentaram A_{492} > 2,0. Estudos em superfícies de diferentes materiais, utilizando um número maior de isolados, estão em desenvolvimento, de forma a identificar e caracterizar os sorotipos e linhagens de *Salmonella* que possam exigir maior rigor na aplicação das boas práticas de fabricação por parte das indústrias de alimentos.

A pesquisa de *Salmonella* em alimentos reveste-se de importância adicional quando esses microrganismos são capazes de produzir biofilmes, uma vez que a sua remoção das fontes de contaminação ou inativação por substâncias sanitizantes ficam dificultadas. (MEYER, 2003)

CONCLUSÃO

Produtos cárneos oferecidos ao consumo humano podem veicular linhagens de *Salmonella* capazes de desencadear a formação de biofilmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

D'AOUST, J.; MAURER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology:** fundamental and frontiers. 2th ed. Washington: ASM, 2001, p. 141-178.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 33-81.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology,** v. 64, p. 367-372, 2001.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 249-253, 2003.

MØRETRØ, T.; HERMANSEN, L.; HOLK, A.L.; SIDHU, M.S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 69, n. 9, p. 5648-5655, 2003.

OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P.; FILHO, E.S.A.; GONÇALVES, P.M.R. Biofilme na indústria de alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 141, p. 33-35, 2006.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industryshould they be a concern? **International Journal of Food Microbiology,** v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994.