

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL POR ISOLADOS DE *Salmonella* spp. PROVENIENTES DE CARCAÇAS BOVINAS

DIEGO PERES ÁVILA¹; YTAIARA LIMA PEREIRA²; LAÍS ABREU ANASTÁCIO³;
PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵;
GRACIELA VÖLZ LOPES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – diiperes1@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ytaiaralima@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – laisabr@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Em 2021, o Brasil produziu um volume de 9,71 milhões de toneladas carcaça equivalente (TEC), das quais 25,51% foram exportadas, principalmente para a China, Estados Unidos (EUA) e União Europeia (EU) (ABIEC, 2022). Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) são um problema mundial que acometem 1 a cada 10 pessoas anualmente, sendo *Salmonella* spp. uma das principais bactérias causadoras de doenças gastrointestinais (OMS, 2018; BRASIL, 2022). Sabendo que esse micro-organismo pode ser encontrado naturalmente no trato intestinal de diversos animais, inclusive da espécie bovina, cuidados sanitários são indispensáveis.

A salmonelose é uma infecção causada por *Salmonella* spp., que cursa com sintomas como diarreia, febre e dor abdominal, geralmente autolimitante (CDC, 2019). A sua transmissão ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados e pode causar sintomatologia severa em pacientes imunocomprometidos, recém nascidos e idosos (BRASIL, 2020). No Brasil, a maioria dos surtos ocorrem dentro de residências e restaurantes, sendo *Salmonella* spp. o terceiro agente etiológico mais identificado em surtos alimentares (BRASIL, 2022). Apesar dos alimentos mais incriminados em surtos de salmonelose serem ovos, carne de frango e carne suína, diversos estudos relatam o seu isolamento em carcaças e carne bovina (CDC, 2019; ALI et al., 2020; RIPOLLES-AVILA et al., 2022; SHAIKU et al., 2021).

Salmonella spp. é capaz de formar biofilme, o qual é definido como um polímero extracelular (EPS) que leva à agregação bacteriana e adesão em diferentes superfícies, como resposta a um estresse ambiental (LIU et al., 2022). Além disso, quando estabelecido, devido a uma deficiência na sanitização, os biofilmes são capazes de causar contaminação cruzada dos alimentos (IANNETTI et al., 2020). Contudo, a sua remoção torna-se dificultada em razão do aumento da resistência dos micro-organismos aos sanitizantes comumente utilizados (ZHU et al., 2022). Sendo assim, a formação de biofilme por *Salmonella* spp. caracteriza-se como um problema nas indústrias de alimentos.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a formação de biofilme em aço inoxidável, material amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, por isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carcaças bovinas de abatedouros-frigoríficos do sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizados 18 isolados de *Salmonella* spp. previamente identificados, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/FAEM/UFPEL). Os isolados foram obtidos entre os anos de 2010/2012 e 2021/2022 de carcaças bovinas provenientes de dois abatedouros-frigoríficos localizados na cidade de Pelotas-RS.

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Andrade et al. (1998), com modificações. A partir de uma cultura de 24 h dos isolados, foram preparados inóculos bacterianos em solução salina 0,85% até atingir a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Alíquotas de 1 mL contendo essa concentração bacteriana foram transferidas para tubos contendo 9 mL de caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia®, USA) e cupons de aço inoxidável AISI 304 (0.366 de rugosidade, 10 mm x 10 mm x 1 mm). Os tubos foram incubados a 25 °C por 24 h. Após esse período, os cupons foram transferidos para tubos contendo 5 mL de água peptonada 0,1% (AP, Oxoid®, UK), e ficaram imersos em repouso por 1 min para remover as células planctônicas ou não aderidas. Logo após, os cupons foram transferidos para tubos contendo 10 mL de AP 0,1%, e submetidos à agitação em vortex por 2 min para a remoção das células sésseis ou aderidas. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas em microtubos contendo 0,9 mL de AP 0,1%, e cada diluição foi semeada em placas de Petri contendo ágar Triptona de Soja (TSA, Kasvi®, BR), as quais foram incubadas a 37 °C durante 24 h. As colônias foram contadas e os resultados foram expressos em Log UFC.cm⁻². Foram realizadas duas repetições do experimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considera-se que um isolado apresenta potencial de formação de biofilme quando este apresenta concentrações de células bacterianas aderidas à superfície superiores a 5 Log UFC.cm⁻². Dessa forma, todos os isolados de *Salmonella* spp. testados (n=18) formaram biofilme em cupons de aço inoxidável, como pode ser observado no **Figura 1**. Dentre eles, os isolados D17, D13 e D3 foram os que demonstraram as maiores contagens; 7,98 Log UFC.cm⁻², 7,91 Log UFC.cm⁻² e 7,88 Log UFC.cm⁻², respectivamente.

Liu et al. (2022) avaliaram a formação de biofilme em microplacas por isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carne bovina, incubados por 25 °C durante 1-5 dias, e também relataram que todos formaram biofilme. Além disso, os autores relataram que o biofilme formado pelos isolados alcançaram maturidade total após quatro dias. Portanto, isso demonstra que em um estabelecimento onde os protocolos de higiene e sanitização são negligenciados, o biofilme pode se estabelecer no ambiente em poucos dias e causar a contaminação dos alimentos.

Outros estudos avaliaram a formação de biofilme por *Salmonella* spp. em diferentes condições. Ripolles-Avila et al. (2022), obtiveram 6,25 Log UFC.cm⁻² para *S. Typhimurium*, quando incubada a 30 °C por 72 h. Entretanto, o foco dos autores foi a avaliação da formação de biofilme sob influência de *Pseudomonas* spp, verificando que *P. fluorescens* e *P. fragi* não influenciaram a formação de biofilme por *S. Typhimurium*, que demonstrou contagens de 6,25 Log UFC.cm⁻² e 6,18 Log UFC.cm⁻², na presença de cada uma das espécies, respectivamente.

Em outro estudo, Obe et al. (2021) avaliaram a formação de biofilme por isolados de *Salmonella* spp. provenientes de equipamentos da avicultura a 25 °C por 48 h, e relataram que 24% (n=6) dos isolados mostraram forte aderência à superfície plástica.

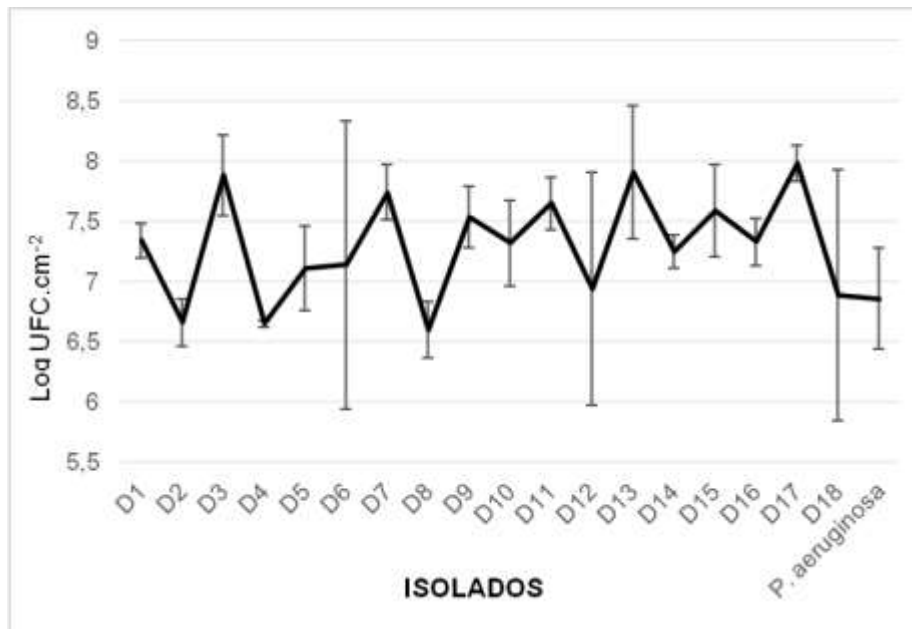


Figura 1. Formação de biofilme em cupons de aço inoxidável por isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carcaças bovinas

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *Salmonella* provenientes de carcaças bovinas de dois frigoríficos da região sul do Rio Grande do Sul apresentam capacidade de formar biofilme em aço inoxidável à temperatura de 25 °C, que corresponde a temperatura ambiente média nas salas de abate, representando um potencial perigo para abatedouros-frigoríficos, bem como para o consumidor final. Dessa forma, ressalta-se que é necessário o investimento em pesquisas relacionadas à alternativas eficazes para a inibição da formação ou remoção de biofilmes microbianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC. **Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil**. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, 1 jun. 2022. Publicações. Acessado em 21 jul. 2022. Online. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>
- ALI, M. Y.; PARVIN, M. S.; TALUKDER, S.; MANDAL, A. K.; RAHMAN, M. T.; ISLAM, M. T. Multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase producing *Salmonella* spp. in red meat of cattle, Bangladesh. **International Journal of Infectious Diseases**, v.101, p.24, 2020.
- ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, p.833-838, 1998.

- BRASIL. **Salmonella (Salmonelose)**. Ministério da Saúde, Assuntos, 10 mai. 2022. Acessado em 22 jul. 2022. Online. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella-salmonelose>
- BRASIL. **Surtos de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil**. Informe 2022, 24 mar. 2022. Acessado em 21 jul. 2022. Online. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf>
- RIPOLLES-AVILA, C.; GUITAN-SANTAMARIA, C.; PIZARRO-GIMÉNEZ, K.; MAZAHARI, T.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J. Dual-species biofilms formation between dominant microbiota isolated from a meat processing industry with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella entérica*: Unravelin their ecological interactions. **Food Microbiology**, v.105, n.104026, 2022.
- RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.
- IANNETTI, L.; SCHIRONE, M.; NERI, D.; VISCIANO, P.; ACCIARI, V.A.; CENTOROTOL, G.; MANGIERI, M.S.; TORRESI, M.; SANTARELLI, G.A.; DI MARZIO, V.; MARFOGLIA, C.; MIGLIORATI, G.; POMILIO, F. *Listeria monocytogenes* in poultry: Detection and strain characterization along na integrated production chain in Italy. **Food Microbiology**, v.91, n.103533, 2020.
- LIU, Y.; YAN, Y.; DONG, P.; NI, L.; ZHANG, Y.; ZHU, L. Inhibitory effects of clove and orégano essential oils on biofilm formation of *Salmonella* Derby isolated from beef processing plant. **LWT – Food Science and Technology**, Online, v.162, n. 113486, 2022.
- MERINO, M.; PROCURA, F.; TREJO, F. M.; BUENO, D. J.; GLOWEZY, M. A. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v.119, p.530-54, 2019.
- OBE, T.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, W.; ZHANG, L.; KIESS, A. Antimicrobial tolerance, biofilm formation and molecular characterization of *Salmonella* isolates from poultry processing equipment. **Journal of Applied Poultry Research**, v.30, n.100195, 2021.
- OMS. **Salmonella (non-typhoidal)**. OMS, 20 fev. 2018. Newsroom. Acessado em 21 jul. 2022. Online. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- SHAIBU, A. O.; OKOLOCHA, E. C.; MAIKAI, B. V.; OLUFEMI, O. T. Isolation and antibiogram of *Salmonella* species from slaughtered cattle and the processing environment in Abuja abattoirs, Nigeria. **Food Control**, v.125, n.107972, 2021.
- ZHU, T.; YANG, C.; BAO, X.; CHEN, F.; GUO, X. Strategies for controlling biofilm in food industry. **Grain & Oil Science and Technology**, Online, 2022.