

## RESISTÊNCIA DE *Salmonella* Enteritidis FORMADORA DE BIOFILME AO HIPOCLORITO DE SÓDIO

MILAN, Camile<sup>1</sup>; AGOSTINETTO, Airton<sup>1</sup>; CONCEIÇÃO, Rita de Cássia dos Santos<sup>1</sup>; DIAS, Priscila Alves<sup>1</sup>; TIMM, Cláudio Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, UFPEL

### 1 INTRODUÇÃO

A carne de frango e seus derivados estão entre os produtos de origem animal de maior importância na transmissão da salmonelose de origem alimentar ao homem (D'AOUST, 2001). Inúmeros surtos de toxinfecção alimentar causados por essa bactéria são conhecidos, envolvendo frequentemente carnes de aves e de outras espécies (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Biofilme é uma comunidade de células bacterianas aderidas a uma superfície por meio de apêndices de natureza protéica ou polissacarídica, referidos como glicocálice, circundadas por uma matriz de polímeros orgânicos (COSTERTON et al. 1999; CRIADO et al., 1994). A formação de biofilme é causa de graves problemas na indústria, pelo fato de dificultar a desinfecção de bancadas e utensílios utilizados no processamento dos alimentos. Adicionalmente, as bactérias oriundas de biofilmes podem apresentar resistência aumentada frente aos agentes antimicrobianos (JOHNSTON & JONES, 1995; JOSEPH et al., 2001). O cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, tem sido o composto químico mais utilizado na sanitização de equipamentos para garantir a qualidade microbiológica dos alimentos. Comparativamente com outros desinfetantes, ele é de baixo custo e de fácil acesso, estando amplamente disponível no comércio (ANDRADE, 1996).

O objetivo do trabalho foi avaliar a resistência de *Salmonella* Enteritidis formadora de biofilme frente ao hipoclorito de sódio.

### 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas duas cepas de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorotipo Enteritidis, uma delas (LIPOA 2017) formadora de biofilme e uma (LIPOA 2018) não formadora. Foram utilizadas placas de superfícies planas com 4 cm<sup>2</sup> de plástico (polietileno de alta densidade), aço inoxidável e vidro. As placas esterilizadas foram coladas em uma haste metálica e inseridas verticalmente em frascos contendo 150 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Michigan, USA) com 1% de glicose. Nos frascos, foram adicionados 3 mL de cultura overnight a 37°C em BHI de cada isolado formador de biofilme e incubados a 37°C. A cada 48 horas de incubação, as placas foram lavadas três vezes suavemente com solução salina para remoção das células não aderidas e novamente inseridas em frascos com 150 mL de BHI, porém sem o inóculo. Após cinco repetições do procedimento, as placas com biofilme foram imersas verticalmente em frascos contendo hipoclorito de sódio (solução contendo 200 ppm de Cl<sub>2</sub>), onde permaneceram durante 10 minutos.

Alcançado o tempo de contato estabelecido, as placas foram imersas em solução neutralizante (tiosulfato de sódio) por 30 segundos. Após lavagem com solução salina, foram passados suabes esterilizados na superfície de cada placa e

transferidos para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. A partir desta, foram feitas diluições seriadas para contagem dos microrganismos em Ágar Padrão para Contagem em Placas (PCA, Acumedia). O experimento foi realizado em triplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cepa de *Salmonella* Enteritidis LIPOA 2017, formadora de biofilme, apresentou contagens mais elevadas após a ação do hipoclorito de sódio, quando comparada à cepa LIPOA 2018, não formadora de biofilme (Tab. 1).

Tabela 1 - Contagens de *Salmonella* Enteritidis produtora (LIPOA 2017) e não produtora (LIPOA 2018) de biofilme em diferentes superfícies, após exposição ao hipoclorito de sódio.

Superfície	Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis* (UFC/cm <sup>2</sup> )			
	2017 com sanitizante	2017 sem sanitizante	2018 com sanitizante	2018 sem sanitizante
Vidro	4,6 x 10 <sup>2</sup>	5,3 x 10 <sup>0</sup>	5,6 x 10 <sup>1</sup>	4,2 x 10 <sup>4</sup>
Alumínio	8,4 x 10 <sup>2</sup>	1,2 x 10 <sup>0</sup>	7,8 x 10 <sup>0</sup>	2,8 x 10 <sup>4</sup>
Poliestireno	2,9 x 10 <sup>3</sup>	3,3 x 10 <sup>0</sup>	1,4 x 10 <sup>2</sup>	3,9 x 10 <sup>3</sup>

\* Média de três repetições

As reduções nas contagens bacterianas após a ação do hipoclorito de sódio foram de 4, 4, 3 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente em vidro, alumínio e poliestireno, para a cepa formadora de biofilme, e de 3, 4 e 1 log UFC/cm<sup>2</sup> para a não formadora. As maiores populações da cepa formadora de biofilme, em relação a não formadora, após a ação do hipoclorito se devem à maior população desta cepa antes do uso do sanitizante e não à uma resistência adicional ao antimicrobiano. Embora as contagens bacterianas obtidas após a etapa de crescimento nas diferentes superfícies tenha sido maior para a cepa LIPOA 2017 do que para LIPOA 2018, as concentrações iniciais foram as mesmas para ambas. Portanto, nas condições da indústria, é de se esperar uma eficiência menor da sanitização dos equipamentos quando a contaminação for por cepas formadoras de biofilme, não por serem mais resistentes ao antimicrobiano, mas por estarem presentes em maior concentração no momento da sanitização, o que foi proporcionado pela sua capacidade de formar biofilme.

A redução das populações de *Salmonella* na superfície de poliestireno foi menor do que as observadas nas superfícies de vidro e alumínio, tanto da cepa formadora como da não formadora de biofilme. Embora as causas dessa diferença não tenham sido estudadas no presente trabalho, é possível que estejam relacionadas a características do material que facilitem a adesão e permanência da bactéria na sua superfície.

Quando *Salmonella* é isolada de produtos de frango, a indústria deve ficar alerta, pois algumas cepas desta bactéria são capazes de formar biofilme em superfícies de equipamentos utilizados no processamento dos alimentos, dificultando sua eliminação. Adicionalmente a esta barreira física, os resultados obtidos neste trabalho são indicativos de que a ação sanitizante também poderá ser menos eficaz sobre as bactérias que formam biofilme, aumentando o risco da veiculação de doenças transmitidas por alimentos (DTA).

### 4 CONCLUSÃO

Cepas de *Salmonella* formadoras de biofilme são mais difíceis de ser eliminadas das superfícies de vidro, alumínio e poliestireno com o uso de hipoclorito de sódio do que cepas não formadoras de biofilme. Esta menor eficiência da sanitização se deve às maiores concentrações populacionais propiciadas pela formação do biofilme.

## 5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 1996.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CRIADO, M.T.; SUAREZ, B.; FERREROS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v. 48, n. 2, p. 123-126, 1994.

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

JOHNSTON, M.D.; JONES, M.V. Disinfection tests with intact biofilms: combined use of de Modified Robbins Device with impedance detections. **Journal of Microbiological Methods**. v. 21, p. 15-26, 1995.

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.