

## **AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Salmonella Typhimurium* E *Staphylococcus aureus* EM POLIPROPILENO.**

Camila Michel de Macedo (PIC/CNPq/Uem), Gabriel Ferraz Bruno (PIC/CNPq/Uem), Jane Martha Graton Mikcha, Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá (orientadora)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Palavras-chaves:** Biofilme, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*.

**Área e subárea do conhecimento** Ciência e tecnologia de alimentos/Microbiologia de alimentos

### **Resumo:**

As bactérias quando encontradas em biofilme apresentam maior resistência a tratamentos antimicrobianos. O biofilme é influenciado por vários fatores, como a temperatura e o pH. Tendo isso em vista, esse trabalho avaliou a influência da temperatura na formação de biofilmes de *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* na superfície de polipropileno. Com a determinação do número de células bacterianas aderidas ao polipropileno após 48 horas de incubação a 25 e 35°C, foi possível observar que *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* apresentaram capacidade de formação de biofilme semelhante em ambas temperaturas.

### **Introdução:**

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) estabelecem um dos mais recorrentes problemas de saúde pública. As DTAs têm como principal origem os microrganismos que contaminam os alimentos e, através da ingestão destes, podem ocorrer graves eventos patológicos no organismo humano. Além dos problemas de saúde dos consumidores, os microrganismos também podem ocasionar grandes perdas para as indústrias alimentícias. Dois dos mais importantes contaminantes de alimentos são *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Estima-se que, mundialmente, 95% dos casos de infecção alimentar são causadas por *Salmonella* spp. e que, 30% dessas infecções são responsáveis por óbitos (1).

Bactérias normalmente existem em dois estados, como células planctônicas, que existem livremente em grandes quantidades, ou aderidas a uma superfície, fazendo parte de um biofilme. Os biofilmes são comunidades de células que buscam estratégias de sobrevivência em ambientes com condições adversas. As células se aderem a superfícies

sólidas com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares que protegem e imobilizam as células (2).

As superfícies que são usadas para manipulação, armazenamento e processamento de alimentos são importantes fontes de contaminação por microrganismos, uma vez que, a transmissão de patógenos na forma de biofilmes aos alimentos pode ocorrer (3).

A adesão das células bacterianas nas superfícies é influenciada por vários fatores, como a presença de material orgânico, a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e comunicação célula-célula (4). Desta forma, foi objetivo deste trabalho avaliar a influência da temperatura na formação de biofilme de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Staphylococcus aureus* em superfície de polipropileno.

## Metodologia:

### 1. Microrganismos testados e preparação do inóculo:

Foi utilizado para o experimento *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028 obtidas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UEM e estocadas em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (Difco™) com 20% de glicerol a -20 °C. Antes do uso uma alíquota dos microrganismos congelados foram transferidos para caldo BHI (TSB) (Difco™) e incubados por 24 horas a 35 °C. Posteriormente, *S. Typhimurium* foi plaqueada em agar Hektoen (Difco) e incubada a 35°C por 24 horas, enquanto o *S. aureus* foi plaqueado em ágar Baird Parker (Difco) e incubado a 35 °C por 48 horas.

### 2. Formação de Biofilme em superfície de polipropileno:

A formação de biofilme foi realizada de acordo com Amaral et al (5). Os isolados bacterianos foram cultivados em Tryptic Soy Broth (TSB - Merck, Darmstadt, Germany) a 35°C *overnight* para se obter 10<sup>7</sup> UFC/mL, confirmado através da contagem de UFC em placas de Hektoen e Baird Parker, para *S. Typhimurium* e *S. aureus*, respectivamente.

Em seguida, foram adicionados 1500 µL do cultivo bacteriano a microtubos que continham cupons de polipropileno (1x8x8 mm), previamente higienizados e esterilizados em autoclave. Os microtubos foram incubados a 35 e 25 °C durante 24 h, e os conteúdos cuidadosamente substituídos por novo TSB e incubados durante mais 24 h a 35 e 25 °C. Após a incubação, os conteúdos dos microtubos foram aspirados e os cupons lavados com solução salina estéril a 0,85%. Posteriormente, 1500 µL de uma solução salina estéril a 0,85% foi adicionada, e os cupons submetidos a um banho de ultrassom a 25 kHz durante 5 min (Ultra Cleaner 750A, Unique) para separar as células sésseis. As diluições em série foram realizadas em solução salina estéril a 0,85%, plaqueadas em ágar de Mueller Hinton (MHA; Difco) e incubadas a 37 °C

durante 24 h. Os resultados foram expressos como log UFC/cm<sup>2</sup>. Os testes foram realizados em duplicata, em dois diferentes experimentos.

### Resultados e discussões:

A formação de biofilme em polipropileno foi obtida para *S. Typhimurium* e *S. aureus*. Conforme mostra a Figura 1, a contagem do número de células bacterianas aderidas ao polipropileno após 48 horas variou entre 7,32 a 7,6 log UFC/cm<sup>2</sup>.

Quando o cupom de polipropileno foi incubado a 25°C por 48 horas a contagem de células viáveis foi de 7,48 log UFC/cm<sup>2</sup> para *S. Typhimurium* e 7,32 log UFC/cm<sup>2</sup> para *S. aureus*.

Após o mesmo período, porém, incubado a 35°C a contagem de células viáveis foi de 7,6 log UFC/cm<sup>2</sup> para *S. Typhimurium* e 7,38 log UFC/cm<sup>2</sup> para *S. aureus*.

Dessa forma, foi possível observar que em diferentes temperaturas (25 e 35°C) a formação do biofilme foi semelhante tanto para *S. Typhimurium* como para *S. aureus*. Portanto, ambas espécies bacterianas apresentaram capacidade de formação de biofilme semelhante em superfície de polipropileno.

Os resultados obtidos são semelhantes aos anteriormente descritos (3,4) por outros estudos que avaliaram a formação do biofilme de *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em superfície de aço e borracha.

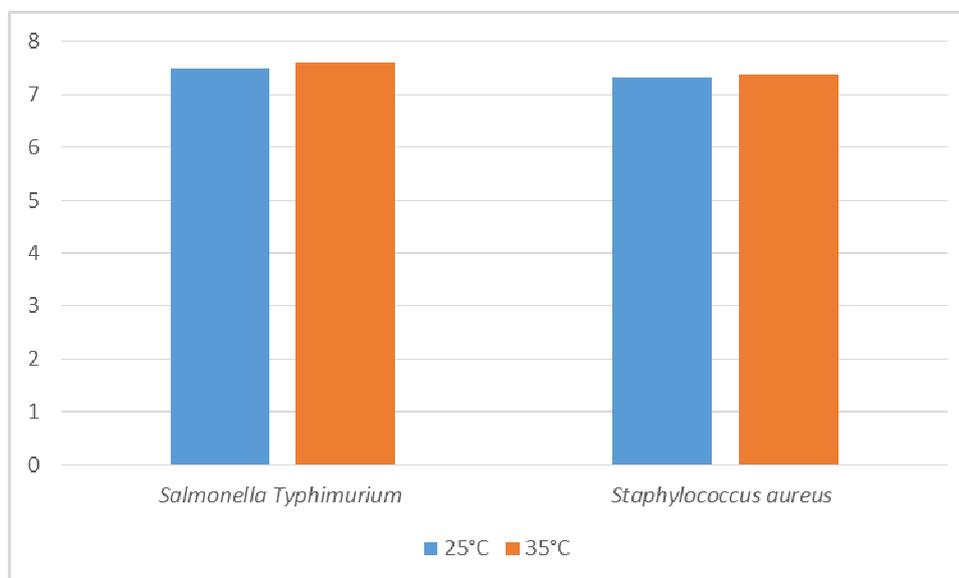


Figura 1: Células bacterianas viáveis em biofilme nas superfícies de polipropileno.

### Conclusão:

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que a variação de temperatura de 25 e 35°C não alterou a capacidade de formação de biofilme de *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* em superfície de polipropileno.

### Agradecimentos:

Agradecemos as alunas de pós-graduação Andreia Farias Pereira Batista e Daliah Alves Coelho Trevisan, que nos auxiliaram durante os experimentos no laboratório, a nossa orientadora Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá e a co-orientadora Jane Martha Graton Mikcha.

### Referências Bibliográficas:

1. HOLMAN, E. L. (2001). *Nontyphoidal salmonellosis*. Clinical Infectious Diseases, 32: 263-269.
2. COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. (1999). **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. Science. 1999; 284 (5418): 1318-22.
3. GORSKI, L., PALUMBO, J., & MANDRELL, R. (2003). **Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility**. Applied and Environmental Microbiology, 69(1), 258-266.
4. MAI, T., & CONNER, D. (2007). **Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel**. International Journal of Food Microbiology, 120, 282-286.
5. AMARAL, V. C. S, SANTOS, P. R, SILVA, A. F., SANTOS, A. R., MACHINSKI JR, M., MIKCHA, J. G. (2015). **Effect of carvacrol and thymol on *Salmonella* spp. biofilms on polypropylene**. International Journal of Food Science and Technology, 50, 2639–2643.