

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS AMBIENTAIS NO CONTROLE
DE BIOFILMES DE *Salmonella* spp. EM SUPERFÍCIES UTILIZADAS
NA INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO DE
FRANGO DE CORTE E DERIVADOS

KEILA CAROLINA DE ORNELLAS DUTKA GARCIA

BOTUCATU - SP

Junho 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS AMBIENTAIS NO CONTROLE
DE BIOFILMES DE *Salmonella* spp. EM SUPERFÍCIES UTILIZADAS
NA INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO DE
FRANGO DE CORTE E DERIVADOS

KEILA CAROLINA DE ORNELLAS DUTKA GARCIA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Forma taxonomizada adequada para envio por meio eletrônico de interesse
 Serviço técnico de identificação e documentação • cliente do sistema • nome
 responsabilidade responsável: JOSEPHINE RODRIGUES VIEIRA-CAS SILVA

Garcia, Keila Carolina Grueiras Dutra.

Utilização de bacteriófagos no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies utilizadas na indústria de processamento e comercialização de frango de corte e derivados / Keila Carolina Grueiras Dutra Garcia. – Botucatu, 2015.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Orientador: Rappold, Lúcio Adrietti Filho.

Capes: 52202000.

1. *Salmonella*. 2. Frango de corte. 3. Biofilmes. 4. Bacteriófagos. 5. Indústria avícola – Subprodutos.

Palavras-chave: Bacteriófagos; Biofilmes; Carne de Frango; *Salmonella* spp..

KEILA CAROLINA DE ORNELLAS DUTKA GARCIA

**UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS AMBIENTAIS NO CONTROLE DE
BIOFILMES DE *Salmonella* spp. EM SUPERFÍCIES UTILIZADAS NA
INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO DE FRANGO
DE CORTE E DERIVADOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Raphael Lucio Andreatti Filho

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Prof. Dr. Terezinha Knobl

Membro

Departamento de Patologia (VPT) - FMVZ/USP - São Paulo - SP.

Prof. Ass. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/UNESP - Botucatu - SP.

Data da defesa: 02 de junho de 2015.

"Twenty years from now, you will be more disappointed by the things that you didn't
do than by the ones you did do.
So throw off the bowlines. Sail away from the safe harbor. Catch the trade winds in
your sails. Explore. Dream. Discover."

Mark Twain

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Adelaide, por amor e carinho que teve comigo nos melhores e piores momentos da minha vida.

Ao meu pai, Nivaldo, por apoiar minhas escolhas, mesmo quando estas não pareçam tão sensatas.

Ao meu irmão, Thomas, pelo qual tenho um imenso carinho e desejo que consiga superar seus problemas e aproveitar o melhor da vida.

Aos irmãos que escolhi, Getúlio, Horácio, Ricardo, Laura, Larissa e Letícia, que mesmo sem saberem, fazem os problemas parecerem menores do que realmente são e deixam a vida bem mais agradável.

Às gurias, Larissa e Isadora, pela ajuda e parceria constantes e pelos vários momentos engraçados que vivemos.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao homem incrível que escolhi para viver ao meu lado pelos próximos anos da minha vida.

*"Em cada passo que eu dava nessa dança
ia perdendo a esperança
você sacou a minha esquizofrenia
e maneirou na condução
Toda vez que eu errava "cê" dizia
pra eu me soltar porque você me conduzia,
mesmo sem jeito eu fui topando essa parada
e no final achei tranquilo..."*

Tulipa Ruiz

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Raphael Andreatti, por toda a ajuda concedida neste período, pela paciência e principalmente pela oportunidade. Com ele aprendi a ser um pouco mais responsável e independente, só tenho a agradecer.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado com o número de processo 2013/07129-9.

Ao Prof. Adriano, do Departamento de Ornitopatologia, por ajudar inúmeras vezes e principalmente pelas soluções inusitadas.

A Prof.a Vera Lúcia do Departamento de Microbiologia, do IB - Campus de Botucatu, pela colaboração no início do trabalho com a disponibilização de tempo e materiais para o desenvolvimento dos pilotos.

Ao Prof. Padovani, do Departamento de Bioestatística, do IB - Campus de Botucatu, pela assistência estatística e pelo conhecimento compartilhado.

Aos antigos e atuais residentes do Laboratório de Ornitopatologia, Bruna, Tarcísio, Igor e Carol, sem os quais seria impossível realizar qualquer experimento. A vocês o meu muito obrigada! Mesmo!

Às gurias da pós, Larissa, Isadora, Tais e Ana, que sempre me ajudaram e pela nossa amizade.

Ao Ricardo (Curan) por disponibilizar suas amostras para o experimento, ao Ricardo (Maria) por me ajudar imensamente com o projeto, e em especial ao Mateus, meu lindo, por quebrar a cabeça comigo e encontrar soluções para os problemas que foram aparecendo.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto. A todos o meu muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. QUANTIDADE DE AMOSTRAS FORMADORAS E CLASSIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME.	17
TABELA 2. QUANTIDADE E TOTAL (%) DE AMOSTRAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. SUSCEPTÍVEIS A AÇÃO DE BACTERIÓFAGOS.	20

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

FIGURA 1. PROCESSOS QUE REGEM A FORMAÇÃO DO BIOFILME: (1) PRÉ-CONDICIONAMENTO DO SUBSTRATO POR MOLÉCULAS DO AMBIENTE, (2) DEPOSIÇÃO CELULAR, (3) ADSORÇÃO CELULAR, (4) DESSORÇÃO, (5) SINALIZAÇÃO CÉLULA A CÉLULA E INÍCIO DA PRODUÇÃO EXOPOLIMÉRICA, (6) TRANSPORTE CONVECTIVO E DIFUSO DE O ₂ E NUTRIENTES, (7) REPLICAÇÃO E CRESCIMENTO, (8) SECREÇÃO DA MATRIX DE POLISSACARÍDEOS, (9) DESPRENDIMENTO, EROÇÃO E DESCAMAÇÃO (BREYERS & RATNER, 2004).	5
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM BACTERÍOFAGO TÍPICO, ADAPTADO DE HANLON, 2007.	8

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

FIGURA 1. DIFERENÇA ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR AMOSTRAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EM SUPERFÍCIES DE INOX, VIDRO E PVC PRESENTES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.	18
FIGURA 2. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE <i>S. ENTERITIDIS</i> AOS BACTERÍOFAGOS ISOLADOS DE ESGOTO, COM VISUALIZAÇÃO DE PLACAS VIRAIS.	19
FIGURA 3. QUANTIDADE DE AMOSTRAS DE <i>SALMONELLA</i> SPP. SUSCEPTÍVEIS A AÇÃO DO POOL DE BACTERÍOFAGOS, EM DIFERENTES PERÍODOS DE INCUBAÇÃO NAS SUPERFÍCIES DE INOX, VIDRO E PVC.	20
FIGURA 4. MICROGRAFIA REPRESENTATIVA DE SUPERFÍCIES DE VIDRO ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM O POOL DE BACTERÍOFAGOS. A) BIOFILME DE 24H DE <i>SALMONELLA</i> SPP. SOBRE VIDRO; B) BIOFILME DE 24H <i>SALMONELLA</i> SPP. APÓS 3H DE AÇÃO DO POOL DE BACTERÍOFAGOS.	21

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1. Introdução	1
1.2. Revisão de literatura	3
1.3. Objetivos.....	9
CAPÍTULO 2 - ARTIGO	10
2.1. Título.....	10
2.2. Resumo	10
2.3. Descrição do problema	11
2.4. Materiais e métodos	13
2.5. Resultados.....	17
2.6. Discussão	21
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 3.....	27
3.1. Conclusões gerais	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

GARCIA, K. C. de O. D. **Utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies na indústria de processamento e comercialização de carcaças de frango de corte e derivados.** Botucatu, 2015. 43p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O biofilme representa uma importante fonte de contaminação de alimentos, podendo estar presente em vários pontos da cadeia de processamento da carne de frango. O controle do biofilme na indústria alimentícia necessita de métodos alternativos, a fim de superar a resistência a desinfetantes comuns e garantir um alimento livre de resíduos químicos. Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência das superfícies de inox, vidro e PVC sobre a formação de biofilmes de *Salmonella* spp. em diferentes momentos, e avaliar a ação lítica de um *pool* de bacteriófagos sobre biofilmes destas bactérias. A maioria das amostras foi classificada como fracas produtoras de biofilme, e os sorovares Heidelberg e Enteritidis apresentaram um número significativamente maior de amostras formadoras. As superfícies de inox e vidro favoreceram significativamente a formação de biofilme em três e cinco períodos, respectivamente. O *pool* de bacteriófagos reduziu a formação de biofilme nas superfícies de inox, vidro e PVC, e seu período de ação concentrou-se principalmente em 3h, porém estes resultados não foram estatisticamente significantes. Nossos achados sugerem que o sorovar e a superfície envolvidos podem interferir significativamente na produção de biofilme, porém através dos métodos utilizados neste estudo, não podemos confirmar a ação de bacteriófagos sobre biofilmes de *Salmonella* spp. nas superfícies de vidro, inox e PVC.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., biofilme, bacteriófago, carne de frango.

GARCIA, K. C. de O. D. **Use of environmental bacteriophages in the control of *Salmonella* spp. biofilm in surfaces from the processing and commercialization industry of chicken carcass and derivatives.** Botucatu, 2015. 43p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Biofilm is a major source of food contamination and may be present in various parts of the chicken meat processing chain. The control of biofilm in the food industry needs alternative methods in order to overcome resistance to disinfectants and ensure food free of chemical residues. The objective of this study was to evaluate the influence of the surfaces of stainless steel, glass and PVC in the biofilm formation by *Salmonella* spp. at different times and evaluate the action of a *pool* of bacteriophages against this bacterial biofilms. Most samples were classified as weak biofilm producers. Heidelberg and Enteritidis serotypes showed a significantly higher number of samples capable to produce biofilm. The surfaces of stainless steel and glass significantly favored the biofilm formation in three and five periods, respectively. The bacteriophage *pool* reduced biofilm formation on the surfaces of stainless steel, glass and PVC and its action period focused mainly at 3h. Our findings suggests that there is a difference in the production of biofilms by different serotypes of *Salmonella* spp., as well as significantly interference of the surfaces in the production of biofilms by this bacteria, however more studies should be conducted in order to characterize the bacteriophage action in the control of biofilms.

Key-Words: *Salmonella* spp., biofilm, bacteriophage, chicken carcass.

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos podem causar grandes impactos na saúde pública e na economia de muitos países. O agente mais comum entre os surtos envolvendo alimentos no mundo todo é *Salmonella*, e também é um dos microrganismos mais importantes relacionados a infecções oportunistas e resistência antimicrobiana. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003), doenças diarreicas como a salmonelose são a segunda principal causa de mortes de crianças abaixo de cinco anos de idade, representando 760.000 mortes a cada ano.

Surtos envolvendo *Salmonella* estão associados à ingestão de alimentos de origem animal contaminados, principalmente o consumo de carne de frango e ovos mal cozidos. A prevalência deste microrganismo é alta nas aves, e sua colonização dos tratos intestinal e reprodutivo favorece a contaminação da carne e ovos (HUR et al., 2011; VAZ et al., 2010). Porém, as superfícies úmidas presentes na indústria de alimentos podem fornecer substrato para o desenvolvimento e permanência de ecossistemas organizados chamados biofilmes, que podem albergar microrganismos patogênicos (BRIDIER et al., 2015).

A formação do biofilme consiste na aderência inicial do microrganismo à superfície, na produção de microcolônias e substâncias poliméricas extracelulares (EPS - extracellular polymeric substances), e é finalizada com sua maturação (CHMIELEWSKI & FRANK, 2003). Evidências indicam que a formação de biofilme aumenta a resistência a produtos antimicrobianos, o que torna um grande desafio sua eliminação das instalações de processamento de alimentos. O surgimento de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos convencionais, revela a necessidade de estudos que explorem novas estratégias de controle do biofilme, por exemplo, o uso de ultrassom, inibidores de *quorum sensing*, enzimas direcionadas a matriz de EPS, e o uso de bacteriófagos (DONLAN, 2009).

Os bacteriófagos são organismos ubiqüitários na natureza. São vírus que infectam bactérias e podem oferecer uma abordagem natural, altamente específica, não tóxica e viável para controlar a formação de biofilmes de várias espécies bacterianas (SIMÕES, 2010). Modificações genéticas de fagos também podem oferecer uma melhoria em sua

eficácia contra biofilmes, e o uso de uma combinação de vários fagos pode prevenir ou minimizar a resistência ao bacteriófago (PARASION, et al., 2014).

Considerando-se a importância de uma abordagem específica e segura para garantir um alimento livre de patógenos para o consumo humano, este trabalho teve como objetivo avaliar a formação de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies comumente encontradas no ambiente de processamento de alimentos (aço inoxidável, vidro e polivinilcloreto), em oito intervalos de 12 horas. E principalmente avaliar a ação de uma associação de bacteriófagos de alto poder lítico, no controle destes biofilmes em três momentos diferentes.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente grande parte da prevalência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) continua desconhecida, porém de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013), estima-se que ocorram 48 milhões de casos de DTA nos EUA por ano, resultando em 128.000 hospitalizações e 3.000 mortes. De acordo com Scallan et al. (2011), as bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por 11% das DTA, 35% das principais causas de hospitalizações e 28% das causas de mortes nos EUA. O *European Food Safety Authority* (EFSA, 2012) e o Centro de Controle e Prevenções de Doenças Europeu relatam a ocorrência de 5.262 surtos de DTA nos países membros da União Europeia, incluindo 43.473 casos em humanos, 4.695 hospitalizações e 25 mortes, somente no ano de 2010. As principais fontes de contaminação foram ovos, refeições mistas e vegetais, e *Salmonella* spp. foi o agente mais frequente, responsável por 99.020 casos confirmados em humanos em toda a União Europeia, incluindo países que não fazem parte da adesão do bloco.

Embora as DTA ainda causem problemas à saúde pública de países desenvolvidos, a situação em países em desenvolvimento, como o Brasil, é bem mais severa. Grande parte da população é mais susceptível a DTA, devido a falta de acesso a água potável, condições de armazenamento e transporte de alimentos frequentemente inapropriadas, e a despreocupação com relação às práticas seguras e higiênicas da produção de alimentos (RITTER; TONDO, 2014). Nos últimos anos, o controle e prevenção das DTA tem melhorado no Brasil, porém ainda existem problemas relacionados ao seu controle por todo o território brasileiro. Entre 2000 e 2013 o Ministério da Saúde registrou 8.857 surtos de DTA, 163.425 pessoas infectadas e 112 mortes. Embora estes sejam os números oficiais, acredita-se que o número de surtos seja muito maior. Durante este mesmo período, *Salmonella* spp. foi identificada como o principal agente de DTA (39,39% dos casos).

Os sorovares de *Salmonella* spp. mais importantes são aqueles envolvidos em quadros de paratifo aviário (ANDREATTI FILHO, 2007), devido à grande disseminação e o difícil controle dos agentes na cadeia produtiva de aves. Desta forma, estes sorovares contaminam os produtos de origem aviária, seus derivados e também equipamentos envolvidos na cadeia produtiva (caminhões, caixas de transporte, equipamentos da indústria) (HEYNDRICKX et al., 2002). Atualmente acredita-se que estes organismos apresentam-se predominantemente sob a forma de biofilme, sendo este

considerado a principal forma de manutenção das bactérias no ambiente e relacionado a aproximadamente 80% das infecções bacterianas em humanos (DAVIES, 2003; HALL-STOODLEY W & STOODLEY, 2009).

A formação de biofilme pode ocorrer em diversos tipos de superfícies, abióticas ou biológicas. Os sorovares Enteritidis e Typhimurium, comumente isolados de surtos envolvendo alimentos, são capazes de formar biofilme em várias superfícies incluindo plástico, vidro, aço inoxidável e até tecidos vivos (BUCKET, 2014). A adesão ocorre mais facilmente em superfícies que possuam irregularidades ou poros, tais como rochas e madeira. No entanto, superfícies aparentemente lisas, como vidro, possuem imperfeições microscópicas que facilitam a adesão destas bactérias (CHAE et al., 2006). Porém a adesão celular depende também de outros fatores, como o meio no qual as bactérias se reproduzem, a motilidade e fase de crescimento das células, tipos e propriedades da superfícies de adesão, presença de matéria orgânica, temperatura, pH, tempo de contato, produção de polissacarídeos extracelulares e comunicação intercelular (GIAOURIS, 2006).

Os biofilmes são aglomerados bacterianos envoltos em uma matriz hidratada sintetizada. Em geral, a formação do biofilme é um processo de duas fases que inicia-se com a aderência da bactéria a uma superfície (Fase de Adesão), e continua com a proliferação e diferenciação das células aderidas (Fase de Maturação), que são controladas por adesinas de superfície e sinalizações de comunicação célula a célula, respectivamente (CHEN; WEN, 2011). Inicialmente ocorre o pré-condicionamento para adesão à superfície, através de macromoléculas presentes no líquido ou em superfícies revestidas intencionalmente. As células são adsorvidas à superfície podendo ocorrer a dessorção das mesmas de forma reversível. A adsorção se torna irreversível por meio de sinalizadores, possibilitando o transporte de substratos para e dentro do biofilme, o metabolismo do substrato pelas células aderidas e o transporte dos produtos para fora do biofilme. Estes processos são acompanhados pelo crescimento celular, replicação, e produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Esta estrutura pode ser removida através de deslocamento ou descamação (Figura 1) (BREYERS; RATNER, 2004).

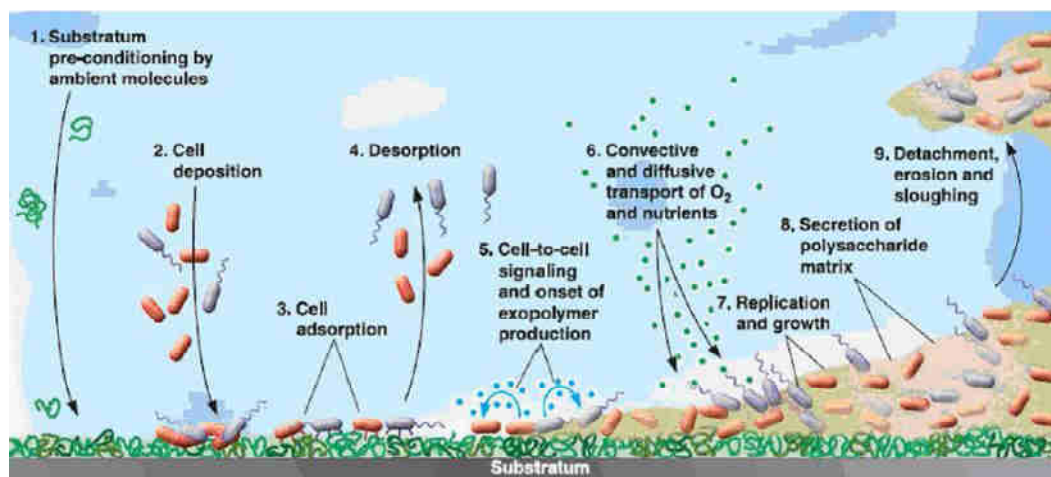


Figura 1. Processos que regem a formação do biofilme: (1) pré-condicionamento do substrato por moléculas do ambiente, (2) deposição celular, (3) adsorção celular, (4) dessorção, (5) sinalização célula a célula e início da produção exopolimérica, (6) transporte convectivo e difuso de O₂ e nutrientes, (7) replicação e crescimento, (8) secreção da matriz de polissacarídeos, (9) desprendimento, erosão e descamação (BREYERS & RATNER, 2004).

Uma característica comum a todos os biofilmes é a secreção celular de uma matriz de EPS, que mantém as células no lugar e fornece um tampão contra o ambiente. A produção de cada matriz é diferente e dependendo das espécies envolvidas e das condições do ambiente, pode haver várias misturas de polissacarídeos, proteínas e até ácidos nucleicos. A matriz extracelular produzida por *Salmonella* contém alguns componentes como fímbrias tipo curli, celulose e a proteína BapA (biofilm-associated protein) que favorecem sua adesão e consequentemente à formação de biofilme. A fímbria tipo curli é um dos principais componentes proteicos de sua matriz, e são consideradas fibras amiloides responsáveis pela adesão à superfície, agregação celular, persistência no ambiente e formação de biofilme. Como segundo principal componente da matriz está a celulose, que possui função estrutural conferindo proteção mecânica, química e biológica às bactérias, e sua deficiência não afeta a virulência do agente, porém pode aumentar sua sensibilidade à compostos de cloro. E coordenando a expressão destes componentes, está uma grande proteína de superfície denominada BapA. A deleção do gene *bapA*, responsável pela secreção da BapA, causa a perda da capacidade de formação de biofilme, e a super expressão de uma cópia cromossômica deste gene aumenta a formação da biomassa do biofilme. Outras estruturas também estão associadas à capacidade de produzir biofilmes, como é o caso dos flagelos. Acredita-se que a produção do flagelo e da matriz extracelular são processos mutuamente exclusivos: a bactéria deixa de mover-se para instalar-se e formar o

biofilme (JONAS et al., 2007; KOLTER & GREENBERG, 2006; LATASA et al., 2005; SOLANO et al., 2002).

A proximidade de uma superfície adequada é percebida pela célula bacteriana, que passa esta informação aos principais genes reguladores. Acredita-se que o mensageiro desta informação seja uma pequena molécula chamada bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP). Baixas concentrações de c-di-GMP são encontradas em células planctônicas, mas estes níveis aumentam assim que a célula deixa o modo de vida nômade (KOLTER; GREENBERG, 2006). Além deste mecanismo, existe um fenômeno chamado *quorum sensing*, ou comunicação célula a célula, que refere-se a habilidade de uma bactéria captar a informação de outras células na população quando estas atingem uma concentração crítica e comunicam-se entre si. A "linguagem" usada nesta comunicação intercelular é baseada em moléculas sinalizadoras pequenas e produzidas pelas próprias bactérias chamadas de autoindutores (AI). Através do uso dos AI, a bactéria é capaz de regular seu comportamento de acordo com a densidade populacional quanto à formação de biofilmes (DEEP, 2011).

No contexto dos biofilmes artificiais de única espécie, diferentemente do crescimento bacteriano em meios de cultura líquidos, que produzem populações homogêneas de células geneticamente idênticas, o crescimento em biofilmes cria uma grande diversidade genética. Isso ocorre porque em qualquer biofilme, as células individuais estão presas no mesmo lugar, e o acesso aos nutrientes irá variar sob a forma de gradientes dentro do biofilme através da atividade metabólica. Como consequência, podem surgir muitos micronichos, com a presença de mutantes espontâneos aleatórios que resultam em um biofilme contendo múltiplos genótipos. Esta diversidade genética dentro de uma cepa pode fornecer uma certa segurança, com isso a população pode se adaptar melhor às mudanças ambientais repentinas quando comparadas àquelas geneticamente homogêneas (KOLTER; GREENBERG, 2006). Desta forma observa-se o desenvolvimento de resistência a antibióticos e a desinfetantes em bactérias formadoras de biofilmes, permitindo que estas continuem vivas após processos de higienização de superfícies ou mesmo terapias com agentes antimicrobianos (GIBSON, 1999; SIMÕES, 2009). Sendo assim, novas tecnologias têm sido criadas e testadas como forma de eliminar biofilmes ou controlar sua formação (AYEBAH, 2005; BAUMANN, 2009; BYUN, 2007; SHARMA, 2005).

Agentes químicos são usados como forma de controle e erradicação da contaminação, porém os biofilmes apresentam uma vasta resistência a tais agentes,

incluindo isotiazolona, compostos quaternários de amônia, halogênios e compostos liberadores de halogênio (GILBERT, 2002). Recentemente, outros métodos tem sido avaliados com sucesso para o controle da formação do biofilme em superfícies de contato com alimentos, entre eles estão o uso de bactérias ácido lácticas como biosanitizantes, bacteriocinas, ionização e radiação ultravioleta, tratamento por ultrassom, ozônio, micro e nanoemulsões, produtos naturais como mel a 0,5% v/v e bacteriófagos como agente antimicrobianos (GIAOURIS, 2014).

O uso de bacteriófagos para o controle de biofilmes apresenta vantagens por várias razões. Eles podem se replicar no local da infecção, assim sua presença concentra-se onde são mais necessários. Durante o ciclo de replicação lítica, a infecção de uma célula hospedeira por um único fago resultará na produção de dezenas ou centenas de partículas virais, dependendo do fago e das cepas do hospedeiro. Alguns fagos também apresentaram a produção de enzimas capazes de degradar a EPS presente em biofilmes (FU, 2010). Além disso, os bacteriófagos apresentam elevada especificidade e grande capacidade de adaptação frente ao desenvolvimento de resistência aos próprios bacteriófagos pelas bactérias, já que o vírus também possuem grande capacidade de mutação (MATSUZAKI et al., 2005).

Os bacteriófagos são dez vezes mais numerosos no ambiente comparados às bactérias, sendo a forma de "vida" mais abundante na Terra, com uma estimativa de 10^{32} bacteriófagos no planeta. São frequentemente isolados de ambientes aquáticos, mas são encontrados geralmente onde a bactéria reside e estão co-envolvidos com as bactérias há mais de 3 a 4 milhões de anos. Há uma variedade de tipos morfológicos de bacteriófagos, embora a maioria apresente as características ilustradas na Figura 2. A cabeça (ou capsídeo) é uma cápsula proteica e frequentemente de formato icosaédrico. Ela contém o genoma viral, que geralmente compreende um DNA de fita dupla. A cauda pode ou não ser uma estrutura contrátil, e a ela normalmente estão conectadas seis fibras contendo receptores em suas pontas, que reconhecem sítios de adesão na superfície da célula bacteriana (HANLON, 2007).

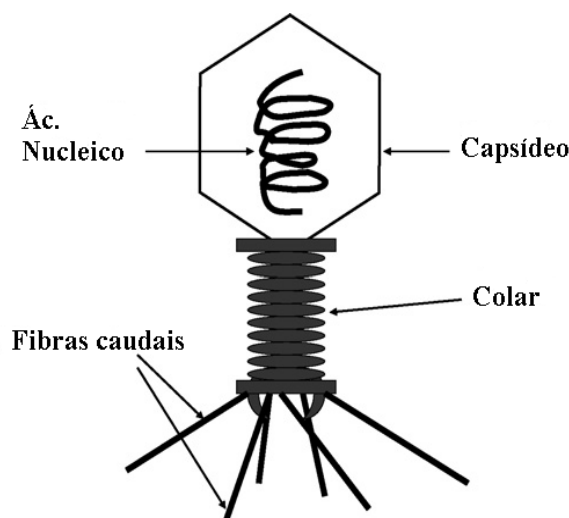


Figura 2. Representação esquemática de um bacteriófago típico, adaptado de HANLON, 2007.

A utilização de bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas é um processo antigo proposto inicialmente por d’Herelle em 1919, mas abandonado devido ao sucesso da antibioticoterapia (BIER, 1984; MAYR & GUERREIRO, 1981). Coquetéis de bacteriófagos mostraram capacidade de reduzir *Salmonella* Enteritidis em amostras de fezes de frango em até 1,3 log. (SKLAR & JOERGER, 2001). A redução na contagem de *S. Enteritidis* em carcaças de frango artificialmente contaminadas e tratadas com bacteriófagos, também foi observada por Fiorentin (2005). Andreatti Filho et al. (2007) observaram bacteriófagos capazes de reduzir, *in vitro*, a recuperação de *S. Enterica* em um log. com apenas duas horas de incubação.

A necessidade de se encontrar maneiras seguras de combater organismos potencialmente patogênicos sob a forma de biofilme na indústria de alimentos, é cada vez maior, pois esta forma de vida possibilita a resistência destes organismos às ferramentas comumente utilizadas para combatê-los, tornando-os de difícil erradicação. Portanto, métodos alternativos devem ser explorados para avaliarmos sua aplicabilidade e segurança no combate a disseminação de patógenos através de alimentos, permitindo que o produto final chegue até o consumidor livre de contaminações. O presente estudo pretende caracterizar a formação de biofilmes de *Salmonella* spp. em três diferentes superfícies, bem como avaliar a ação de uma combinação de bacteriófagos de alto poder lítico frente a estes biofilmes.

1.3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a ação de bacteriófagos no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em diferentes momentos, em superfícies de polivinilcloro (PVC), aço inoxidável (inox) e vidro.

Objetivos específicos:

- Caracterizar a formação de biofilme entre cepas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, *S. Mbandaka* e *S. Kentucky* em oito momentos diferentes.
- Avaliar se existem diferenças entre as superfícies analíticas de vidro, inox e PVC quanto ao favorecimento à formação de biofilme.
- Selecionar bacteriófagos de alto poder lítico sobre amostras formadoras de biofilme e medir seu tempo de ação frente aos mesmos.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO A SER ENVIADO PARA O PERIÓDICO INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY

2.1. TÍTULO:

UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS AMBIENTAIS NO CONTROLE DE BIOFILMES DE *SALMONELLA* EM SUPERFÍCIES PRESENTES NA INDÚSTRIA DE FRANGO DE CORTE

2.2. RESUMO

As doenças transmitidas pelos alimentos representam um grande risco à saúde pública em todo o mundo. Bactérias patogênicas podem viver sob a forma de biofilme dentro da indústria de alimentos, constituindo uma fonte permanente de contaminação. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos tipos de superfícies de adesão sobre a formação do biofilme em oito momentos diferentes, e analisar o tempo de ação de um *pool* de bacteriófagos sobre biofilmes já estabelecidos. A maioria das amostras utilizadas foram classificadas como fracas produtoras de biofilme, e os sorovares Enteritidis e Heidelberg foram os que apresentaram a maior frequência de formação. As superfícies de vidro e inox favoreceram significativamente a formação do biofilme em cinco e três momentos respectivamente, entretanto a superfície de PVC não favoreceu a produção de biofilme, sugerindo que o tipo de material pode interferir na sua produção. O período de ação do *pool* de bacteriófagos concentrou-se em 3h, porém o tratamento de 9h sobre biofilmes na superfície de vidro apresentou-se superior aos demais tratamentos, pois atingiu o maior número de amostras. Estes resultados sugerem que alguns tipos de superfícies e sorovares de *Salmonella* podem favorecer a formação de biofilmes, e apontam o uso de bacteriófagos como uma alternativa para o controle de biofilmes nas indústrias, porém ainda existe a necessidade de mais estudos para comprovar a eficiência e segurança da fagoterapia como alternativa no controle antimicrobiano.

PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella* spp., biofilme, bacteriófago, carne de frango.

2.3. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam uma grande ameaça à saúde pública em todo o mundo. Muitos casos já foram registrados no passado, porém a probabilidade de ocorrerem permanece alta. Nos EUA, estima-se que ocorram 48 milhões de casos envolvendo DTA por ano, resultando em 128.000 hospitalizações e 3.000 mortes (CDC, 2013). No Brasil, o Ministério da Saúde (2009) registrou 8.857 surtos de DTA, com 163.425 casos e 112 mortes no período de 2000 a 2013. Neste contexto, a salmonelose representa uma das DTA mais desafiadoras, e constitui um dos principais problemas para a saúde pública na maioria dos países. Uma das causas de contaminação de alimentos é a adesão de bactérias às superfícies de processamento, onde a presença de resíduos orgânicos no ambiente e nos equipamentos frigoríficos podem fornecer condições para o desenvolvimento e a persistência de comunidades organizadas denominadas biofilmes, que podem conter bactérias patogênicas e atuar como fonte de contaminação cruzada (Bridier et al., 2014; Srey et al., 2013).

Grande parte das bactérias patogênicas associadas a DTA são capazes de aderir e formar biofilme em diversos tipos de materiais como plástico, metal, vidro, madeira e produtos alimentícios, e sob quase todas as condições existentes nas plantas de processamento de alimentos (Winkelströter et al., 2014). Um exemplo dessa relação foi representado por uma população de bactérias naturais da carcaça de frango capazes de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, com diferentes tipos de acabamentos (Arnold e Bailey, 2000). A primeira publicação sobre biofilme de bactérias responsáveis por DTA ocorreu em 1966 (Duguid et al., 1966), com a descrição das propriedades adesivas da *Salmonella* sp., e desde então, muitas bactérias foram identificadas como importantes formadoras de biofilme na indústria de alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 (Elhariry, 2011; Simões et al., 2010). Estar sob a forma de biofilme garante à bactéria uma proteção contra fatores de estresse no ambiente, como o uso de desinfetantes. Desta forma os microrganismos podem persistir no ambiente, causando problemas de higiene e de segurança do alimento, e também podem produzir perdas econômicas devido a deterioração e redução do tempo de prateleira dos alimentos (Shi e Zhu, 2009).

Para combater a aderência e formação de biofilmes microbianos são utilizadas diversas ferramentas, e a aplicação regular de procedimentos de limpeza e desinfecção

são estratégias comuns em equipamentos industriais e nos próprios produtos, porém tais procedimentos não são totalmente efetivos em biofilmes e podem induzir a seleção de fenótipos resistentes (Bridier et al., 2014). Uma vez formados, os biofilmes são extremamente difíceis de serem removidos, como é o exemplo de biofilmes de *S. Typhimurium* formados em diferentes superfícies apresentando resistência à ação do hipoclorito de sódio (Lapidot et al., 2006; Scher et al., 2005). Outros nove desinfetantes também foram testados quanto sua eficácia frente à células de *Salmonella* planctônicas e àquelas associadas a biofilmes, e somente desinfetantes contendo 70% de etanol foram efetivos contra as células do biofilme (Møretrø et al., 2009). Sanitizantes como etanol, fosfato trissódico e iodo também apresentaram ação reduzida nas células associadas a biofilmes quando comparada a ação em células planctônicas (Van Houdt e Michiels, 2010).

A maioria das estratégias convencionais de controle de biofilme é baseada na ação de agentes químicos, porém o desenvolvimento da resistência antimicrobiana associada a resistência apresentada pelas comunidades microbianas estruturadas, e a atual demanda pela redução do uso de antimicrobianos, abre caminho para explorar novas estratégias a fim de garantir alimentos seguros (Schlisselberg e Yaron, 2013). Portanto novas abordagens para o controle de biofilmes tem sido estudadas como possíveis ferramentas biológicas incluindo o uso de enzimas, bacteriófagos, interações microbianas e moléculas metabólicas (Srey et al., 2013). Recentemente o interesse a respeito do uso de bacteriófagos (fagos) como potenciais candidatos para atacar biofilmes de patógenos aumentou, e alguns estudos já comprovaram a ação de bacteriófagos naturais e modificados contra biofilmes de patógenos relacionados a DTA, como é o exemplo de Lu & Collins (2007) que apresentaram um bacteriófago modificado, expressando uma enzima de degradação de biofilme, capaz de reduzir em 99,997% a contagem celular em um biofilme pré-formado de *Escherichia coli* em superfície de plástico. Em 2007, o FDA (Food and Drug Administration) nos EUA aprovou o uso de um bacteriófago natural com ação específica contra *Listeria*, "Listex P100", para a preservação em produtos cárneos prontos para o consumo e produtos de delicatessens.

Bacteriófagos, parasitas obrigatórios de bactérias, possuem características promissoras para o controle de patógenos relacionados à DTA, são considerados efetivos na inibição da formação de biofilmes e na dispersão de biofilmes maduros. Este vírus apresenta uma abordagem mais natural em relação aos métodos tradicionais

utilizados na segurança e preservação de alimentos (Hosseinioust et al., 2013; Strauch et al., 2007). Neste contexto, nosso estudo teve como objetivo avaliar a ação de uma combinação de bacteriófagos para o controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em três superfícies diferentes, aço inoxidável, vidro e polivinil cloreto (PVC), todas muito comuns na indústria de alimentos, e também caracterizar a formação do biofilme em oito intervalos de tempo nas mesmas superfícies citadas anteriormente.

2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1. Amplificação e Seleção de *Salmonella* spp.

Cento e vinte e três amostras de *Salmonella* spp. foram avaliadas quanto a sua capacidade de formação de biofilme. As amostras foram isoladas de carcaças de frango e material avícola, pertencem ao Laboratório de Microbiologia do Serviço de Orientação à Saúde Pública (SOAP) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública e ao Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária respectivamente, ambos localizados na FMVZ da UNESP - Campus de Botucatu. Todas sorotipadas no Instituto Adolfo Lutz - SP. Os sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, *S. Mbandaka* e *S. Kentucky* utilizados neste estudo foram selecionados por sua relevância, de acordo com os dados de prevalência de *Salmonella* spp. em surtos de DTA no Brasil e no mundo (Kottwitz et al., 2010; CDC, 2009; Silva e Duarte, 2002). Anterior ao experimento as cepas foram semeadas em 5mL do caldo tryptic soy broth (TSB) por 24 horas a 35°C e então diluídas em meio TSB, na concentração de 1/20 (TSB 1/20), com o auxílio da escala de Mc Farland associada a contagem microbiológica em placa, até a obtenção de uma cultura de concentração 10^8 UFC/mL. Alíquotas de 250µL desta diluição de cada amostra foram acondicionadas em triplicata em microplaca de fundo chato de 96 poços e incubadas por 24h a 35°C. Para a leitura das placas o conteúdo foi desprezado e a placa lavada três vezes com solução tampão (PBS; pH 7,2) para eliminação de células não aderidas. As células remanescentes foram fixadas por meio da adição de 250µL de metanol a 99% por 15min, em seguida o conteúdo foi novamente desprezado e, após secagem da placa, foram adicionados 250µL do corante cristal violeta a 1% por 5min. Após este período, o excesso de corante foi removido por lavagem em água corrente e depois de seca a placa, foram adicionados 250µL de ácido acético glacial 33% por 15min para ressolubilização

de células aderidas, e em seguida realizada a leitura da microplaca utilizando-se o fotômetro da marca TP-Reader[®] com comprimento de onda de 630nm.

As amostras foram classificadas de acordo com a densidade óptica (D.O.) do biofilme bacteriano nas seguintes categorias: não produtora de biofilme, fraca, moderada ou forte produtora de biofilme (Stepanović et al., 2000). O valor de corte para a D.O. (D.O.c) foi definido como três desvios padrões acima da média do controle negativo, sendo este o TSB 1/20 não inoculado, semeado desde o início do teste, para correção do valor de absorbância. As cepas foram classificadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} OD \leq OD_c &= \text{não produtora de biofilme} \\ OD_c < OD \leq (2 \times OD_c) &= \text{fraca produtora de biofilme} \\ (2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c) &= \text{produtora moderada de biofilme} \\ (4 \times OD_c) \leq OD &= \text{forte produtora de biofilme} \end{aligned}$$

2.4.2. Amplificação e Seleção de Bacteriófagos

As dez amostras de bacteriófagos utilizadas neste estudo foram previamente isoladas de água residual hospitalar e água residual avícola, elas pertencem ao Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ na UNESP - Campus de Botucatu. Para a amplificação antes do experimento, foram utilizados 10mL de caldo TSB duplamente concentrado, em tubos de fundo cônico (Falcon) com capacidade para 50mL. Em seguida foram depositados 1mL de cada amostra de bacteriófago e 2mL de cultura turva de *Salmonella* spp. Cada frasco foi homogeneizado e incubado a 37°C por 18 horas. Esta cultura foi centrifugada a 3.500 RPM por 15 minutos e filtrada com filtro de seringa de 0,22µm de porosidade, e sofreu o mesmo processo de amplificação novamente.

2.4.3. Preparo das Fichas Analíticas

Para este estudo foram utilizadas unidades analíticas que mimetizassem superfícies de inox, vidro e polivinil cloreto encontradas na indústria. Para representar as superfícies de inox e PVC, foram realizados cortes circulares a laser (1cm) em aço inoxidável de acabamento laminado a frio 2B, e quadrados (1cm²) a tesoura,

respectivamente, e para o vidro foram utilizadas lamínulas circulares (Glasscyto®) de 13mm de diâmetro. As unidades de PVC e vidro foram esterilizadas através de imersão em hipoclorito de sódio a 5% (v.v.) por duas horas, e então lavadas com água deionizada estéril. As fichas de inox foram esterilizadas a partir de autoclavagem a 120°C por 30 min. Todos os materiais foram acomodados em placas de Petri e secos em estufa, e 1% das fichas de cada material foi incubada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), a 35°C por 24h, para garantir a inocuidade das fichas.

2.4.4. Avaliação da Formação de Biofilme nas Superfícies Analíticas (Experimento 1)

As amostras de *Salmonella* spp. selecionadas como formadoras de biofilme foram incubadas em TSB a 37°C por 24 horas, e então diluídas em caldo TSB 1/20 na concentração de 10^8 UFC/mL, como descrito no item 2.4.1.. Seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2014), as fichas analíticas estéreis foram depositadas no fundo de cada poço das placas de cultivo celular de 24 poços, das marcas TPP® e SPL®, com o auxílio de pinça estéril, e então uma alíquota de 600µL da diluição foi depositada em triplicata nos poços contendo a unidade analítica. O controle negativo do biofilme nas placas foi feito em triplicata, utilizando 600µL de caldo TSB 1/20 não inoculado. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e as leituras realizadas nos seguintes momentos de incubação: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96h.

Passado o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e as fichas passadas para novas placas estéreis com o auxílio de pinça estéril. Nas placas novas, as fichas foram lavadas três vezes com solução tampão (PBS) e coradas com cristal violeta a 1% por 15 minutos. Após este período as fichas foram lavadas novamente com PBS para retirar o excesso de corante, e para ressolubilização das células aderidas foram adicionados 300µL de ácido acético glacial a 33%, por 15 minutos. Um volume de 200µL foi transferido a uma microplaca de fundo chato de 96 poços para a leitura na TP-Reader®. A classificação das amostras quanto a sua formação de biofilme foi realizada de acordo com critério descrito no item 2.4.1..

2.4.5. Seleção e Avaliação da Ação de Bacteriófagos Sobre Biofilmes de *Salmonella* spp. (Experimento 2)

A avaliação da ação de bacteriófagos no controle de biofilmes, foi realizada a partir da administração de uma combinação, ou *pool*, de fagos de maior ação lítica sobre *Salmonella* formadoras de biofilme. Foram selecionadas 20 amostras de *Salmonella* spp. que foram capazes de formar biofilmes pelo menos três vezes em cada momento e superfície, conforme descrito no experimento 1. Cada amostra foi previamente incubada a 37°C por 24 horas, e então semeada em duplicata em placas contendo ágar Triptona de soja (TSA). 10µL da solução de cada um dos dez bacteriófagos isolados contendo 10⁹ UFP/mL, foi depositada nas placas semeadas com *Salmonella* spp., totalizando cinco gotas por placa. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a ação do bacteriófago foi verificada pela presença ou ausência de zonas de lise sobre a *Salmonella* hospedeira. A partir dos resultados foram selecionados três bacteriófagos que apresentaram maior ação lítica para composição de um *pool* a ser administrado em biofilmes de *Salmonella* spp. Para o preparo do *pool*, as amostras de bacteriófagos foram amplificadas separadamente e unidas na proporção de 1:1:1, somente ao final do processo de amplificação de cada amostra.

A ação do *pool* de bacteriófagos foi avaliada em biofilmes de menor e maior tempo de formação, totalizando 8 momentos com intervalos de 12h entre eles. As placas com as unidades analíticas foram preparadas e incubadas como descrito no item 2.4.3.. Após cada período de incubação do biofilme, 300µL do *pool* de bacteriófagos com 10⁸ UFP/mL foi inoculada na placa contendo o biofilme e a superfície analítica, e então as leituras foram realizadas em três momentos diferentes: 3, 6 e 9h após sua administração. Nesta etapa, as amostras de *Salmonella* spp. foram incubadas em triplicata duas vezes. Uma triplicata com e outra sem a adição dos fagos, sendo que cada amostra foi utilizada como o seu próprio controle positivo. O controle negativo, caldo TSB 1/20, também foi utilizado em todas as incubações. Para visualização das células aderidas às superfícies de PVC, inox e vidro, as fichas analíticas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) por 48h e processadas de acordo com o protocolo de rotina do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB - UNESP.

2.4.6. Análise Estatística

A análise dos resultados obtidos sobre a formação de biofilme por *Salmonella* spp. nas três superfícies foi realizada por meio do teste de associação de Goodman, complementado com as comparações múltiplas entre e dentro de populações multinominais (Goodman, 1965; 1964), considerando o nível de 5% de significância. Os dados obtidos do experimento 2 são verdadeiros, porém não suportam procedimento interferencial estatístico e portanto serão apresentados de forma descritiva.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Seleção de Amostras para Formação de Biofilme

Para avaliarmos a formação de biofilmes em superfícies foram selecionadas amostras que apresentaram o potencial para formação. Das 123 amostras disponíveis para estudo somente 58 delas mostraram-se capazes de formar biofilme, pelo menos uma vez. A quantidade de amostras formadoras de cada sorovar, bem como sua classificação quanto a produção de biofilme, estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de amostras formadoras e classificação da intensidade da produção de biofilme.

Sorovar	Nº amostras positivas / Nº total de amostras (%)		
	Fraca	Moderada	Forte
Enteritidis	36/63 (57)*	-	-
Typhimurium	3/10 (30)	-	-
Heidelberg	10/14 (71)*	1/14 (0,1)	-
Mbandaka	6/14 (43)	-	-
Kentucky	2/10 (20)	-	-
Senftenberg	1/12 (8)	-	-

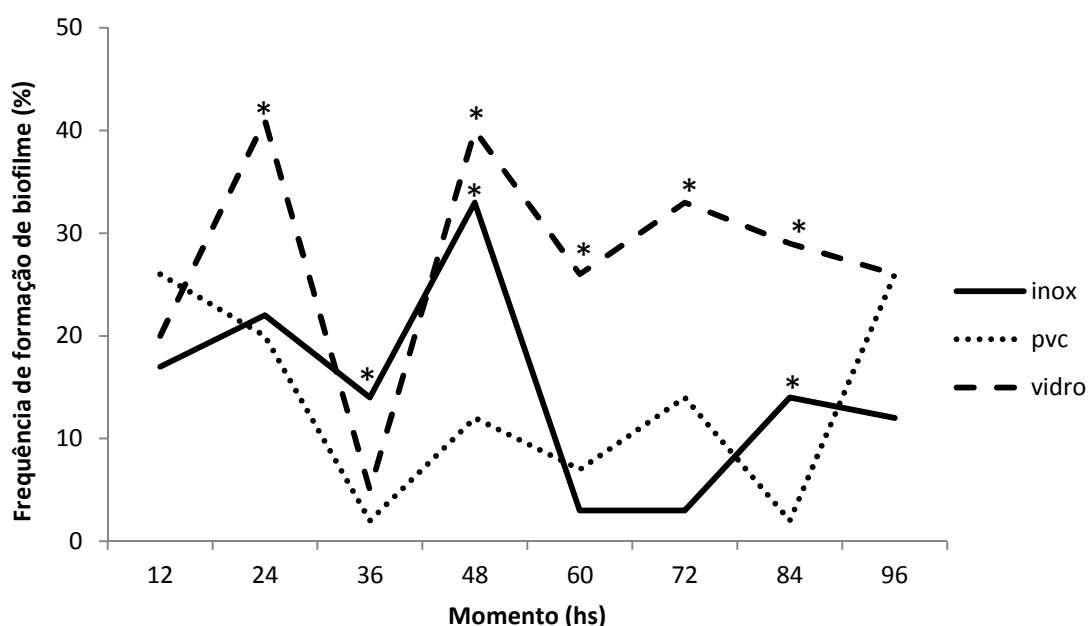
* Indicam os sorovares que apresentaram produção significativamente diferente dos demais ($p < 0,05$).

Experimento 1

Cinquenta e oito amostras de *Salmonella* spp. foram selecionadas quanto a sua capacidade de formarem biofilme, como descrito no item 2.4.4, para avaliar a relação entre o tipo de material da superfície de adesão e o tempo necessário para se estabelecer o biofilme. A frequência de formação de biofilme pelas amostras foi registrada em oito momentos distintos, sendo o intervalo entre eles de 12 horas. De acordo com os

resultados obtidos através das leituras (Fig. 1), observou-se que os materiais de inox e vidro favoreceram ($p < 0,05$) a formação de biofilmes pela *Salmonella* spp., porém a superfície de PVC não foi favoreceu a produção de biofilme. Além disso, o vidro apresentou vantagem em relação ao inox quanto ao favorecimento da formação de biofilme na maioria dos momentos. Os momentos de 24h e 48h apresentaram as maiores frequências de formação de biofilme por amostras de *Salmonella* spp..

Figura 1. Diferença entre as frequências de formação de biofilme por amostras de *Salmonella* spp. em superfícies de inox, vidro e PVC presentes na indústria de alimentos.



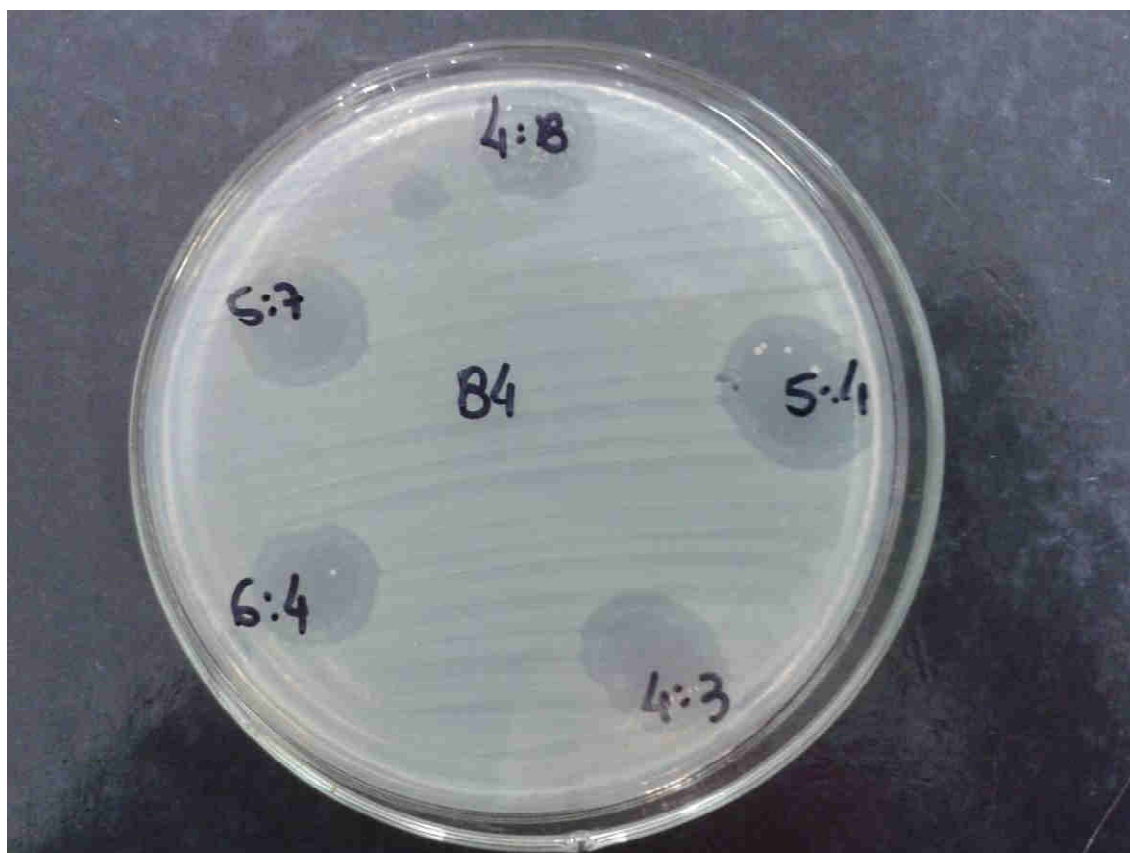
*Indicam os momentos onde há diferença estatística entre as superfícies de adesão ($p < 0,05$).

Experimento 2

Inicialmente as 10 amostras de bacteriófagos isolados de esgoto, utilizados neste estudo, tiveram sua ação lítica avaliada em relação à cepas de *Salmonella* spp. capazes de produzir biofilme com a observação das zonas de lise (Fig. 2). A partir dos resultados, apresentados na Tabela 2, foi possível selecionar os bacteriófagos 4.3, 4.8 e 5.7 que apresentaram ação lítica sobre a maioria das bactérias. A ação dos bacteriófagos foi observada na maioria das amostras, porém os sorovares Mbandaka e Senftenberg foram mais resistentes que os demais sorovares.

Para avaliarmos a ação do *pool* de bacteriófagos em biofilmes de *Salmonella* spp. nas superfícies de inox, vidro e PVC, foram utilizadas 20 amostras de *Salmonella* spp. Selecionou-se apenas amostras de bactérias que produziram biofilme em pelo menos três repetições do ensaio realizado no Experimento 1. Para verificar a ação do *pool* de fagos em biofilmes formados, comparou-se os valores de D.O. de cada cepa de *Salmonella* spp. tratada com os bacteriófagos, com os valores de cada amostra bacteriana como controle positivo. O tratamento de 3h com o pool de fagos agiu sobre pelo menos uma amostra em biofilmes de 12 e 24h no inox, 12, 48, 84 e 96h no PVC, e 12 e 72h no vidro. Porém o mesmo tratamento foi superior em biofilmes de 24h em PVC e vidro, atingindo o dobro e o triplo de amostras respectivamente. Entretanto, a ação dos tratamentos com 6 e 9h de ação dos fagos só foi observada em biofilmes de 24h nas superfícies de inox e vidro, atingindo uma e seis amostras respectivamente (Fig. 3).

Figura 2. Teste de susceptibilidade de *S. Enteritidis* aos bacteriófagos isolados de esgoto, com visualização de placas virais.

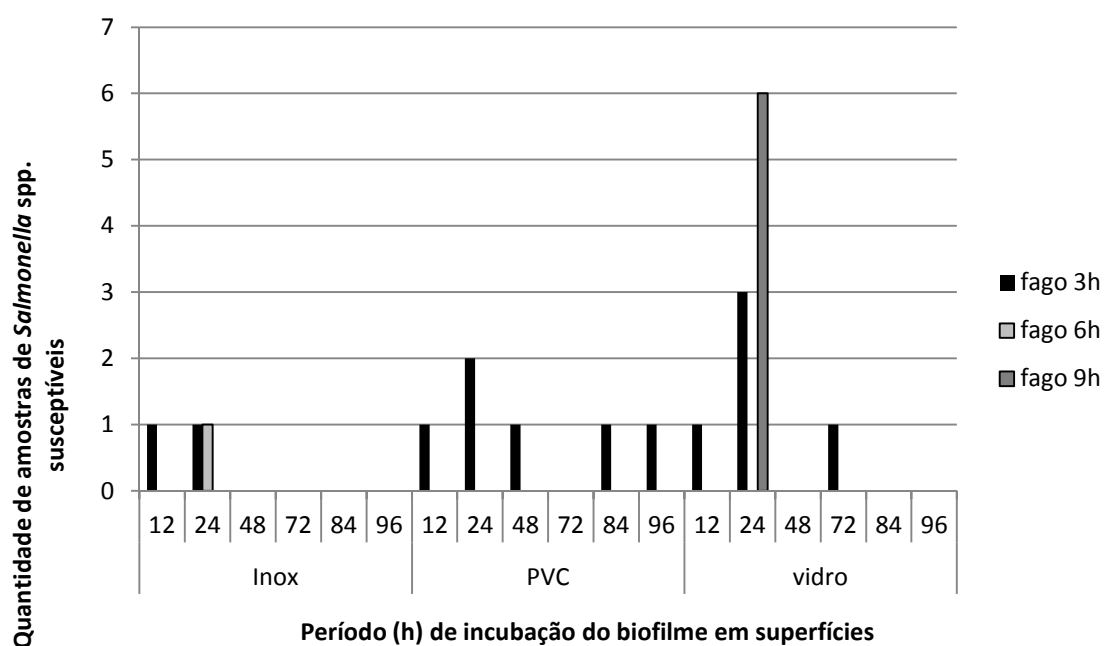


* Os números 4:8, 5:4, 4:3, 6:4, 5:7 representam a identificação das amostras de bacteriófago, e o número 84 indica uma amostra de *S. Enteritidis*.

Tabela 2. Quantidade e total (%) de amostras de *Salmonella* spp. susceptíveis a ação de bacteriófagos.

Bacteriófagos	Sorovares						Total (%)
	Enteritidis	Heidelberg	Kentucky	Mbandaka	Senftenberg	Typhimurium	
4.2	14/36 (39)	5/10 (50)	0/2 (0)	1/6 (17)	0/1 (0)	2/3 (67)	38
4.3	14/36 (38)	5/10 (50)	1/2 (50)	1/6 (17)	0/1 (0)	3/3 (100)	41
4.8	22/36 (60)	5/10 (50)	1/2 (50)	0/6 (0)	0/1 (0)	3/3 (100)	53
5.1	8/36 (21)	6/10 (60)	1/2 (50)	0/6 (0)	0/1 (0)	3/3 (100)	31
5.4	6/36 (18)	3/10 (30)	1/2 (50)	1/6 (17)	0/1 (0)	3/3 (100)	24
5.5	16/36 (44)	4/10 (40)	0/2 (0)	0/6 (0)	0/1 (0)	2/3 (67)	38
5.7	15/36 (42)	5/10 (50)	1/2 (50)	1/6 (17)	0/1 (0)	3/3 (100)	43
6.4	6/36 (18)	5/10 (50)	1/2 (50)	0/6 (0)	0/1 (0)	3/3 (100)	25
6.6	14/36 (38)	5/10 (50)	1/2 (50)	0/6 (0)	0/1 (0)	3/3 (100)	39
6.9	16/36 (44)	3/10 (30)	1/2 (50)	0/6 (0)	0/1 (0)	3/3 (100)	39

Figura 3. Quantidade de amostras de *Salmonella* spp. susceptíveis a ação do pool de bacteriófagos, em diferentes períodos de incubação nas superfícies de inox, vidro e PVC.



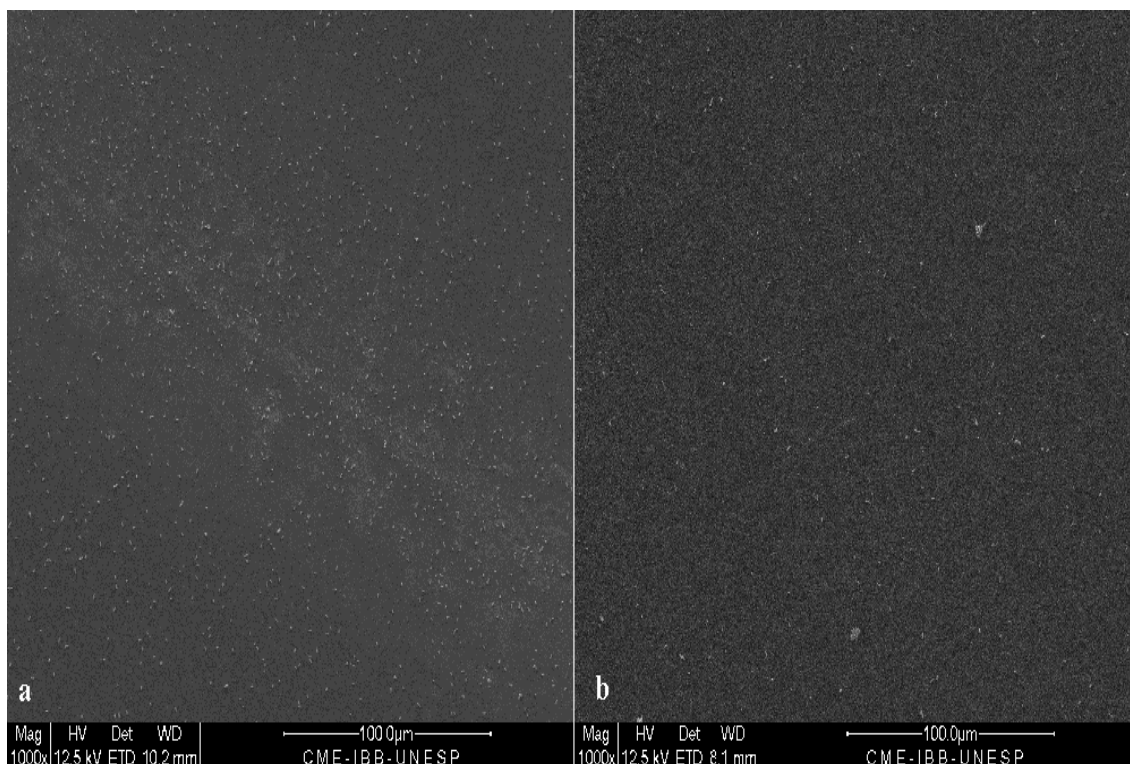


Figura 4. Micrografia representativa de superfícies de vidro antes e depois do tratamento com o *pool* de bacteriófagos. a) Biofilme de 24h de *Salmonella* spp. sobre vidro; b) Biofilme de 24h *Salmonella* spp. após 3h de ação do *pool* de bacteriófagos.

2.6. DISCUSSÃO

Embora a indústria de alimentos tenha evoluído nas últimas décadas, o risco de contaminação durante o processamento dos alimentos permanece elevado. A presença de biofilme em estabelecimentos responsáveis pelo processamento e comercialização de alimentos, constitui a principal causa de contaminação. Caracterizar o comportamento de determinados microrganismos quanto a sua predileção por alguns materiais, ou identificar o intervalo de tempo que este organismo leva para estabelecer-se no ambiente, são essenciais para a escolha de uma abordagem segura e eficiente para garantir ao consumidor um produto sanitariamente seguro.

Neste estudo foi avaliado se há uma possível predileção de bactérias do gênero *Salmonella* spp. quanto ao tipo de superfície de adesão comumente encontrada na indústria, como inox, vidro e PVC, observando como a formação destes biofilmes evoluem em oito momentos específicos, e principalmente se a combinação de bacteriófagos, de ação lítica comprovada, pode eliminar ou controlar a formação de biofilme por estes patógenos.

Foram analisadas cepas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Mbandaka*, *S. Senftenberg* e *S. Kentucky*, totalizando 123 amostras. Observou-se que somente 47% das amostras foram capazes de formar biofilme na microplaca de poliestireno, e foi possível observar que os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* tiveram significativamente o maior número de amostras formadoras de biofilme. Entre as 58 amostras selecionadas para formação de biofilmes em superfícies, 57 delas foram classificadas como fracas formadoras, e somente uma amostra do sorovar *S. Heidelberg* obteve a classificação moderada quanto a sua capacidade de produção de biofilme, entretanto outros estudos revelam amostras de *Salmonella* spp. com classificações moderada e forte para a produção de biofilme (Stepanović et al., 2004). Vestby et al. (2009), estudaram a correlação entre a persistência de *Salmonella* spp. em ambientes industriais com a habilidade de formar biofilme. Eles observaram que os sorovares *Agona* e *Montevideo* são constantemente isolados de ambientes da indústria de alimentos e são classificados como fortes produtores de biofilme. Já o sorovar *Senftenberg* também está presente no ambiente industrial, porém não sobrevive por períodos tão prolongados como os sorovares citados anteriormente, apresentando produção moderada de biofilme. E, finalmente o sorovar *Typhimurium*, que raramente é isolado da indústria alimentícia e é considerado um fraco produtor de biofilme. Estes dados sugerem que a habilidade de formar biofilme está diretamente relacionada a persistência de microrganismos como *Salmonella* spp. em ambientes de processamento de alimentos.

Os achados obtidos no experimento 1, apresentaram os materiais vidro e inox favorecendo significativamente a formação de biofilme por amostras de *Salmonella* spp. Embora ambos tenham favorecido a produção do biofilme, o vidro apresentou-se com a maior frequência de produção com 24, 48, 60, 72 e 84h de incubação, enquanto o inox foi favorável a formação do biofilme com 36, 48 e 84h. Apesar de muitos trabalhos sugerirem a produção de biofilme por alguns sorovares de *Salmonella* spp. em superfícies de vidro, inox e PVC (Prouty et al., 2002), nossos resultados não apresentaram uma formação significativa de biofilme na superfície de PVC nas amostras analisadas. Estes resultados não nos permitem concluir as causas pelas quais não houve formação de biofilme nesta superfície em particular, porém muitos trabalhos evidenciam que fatores como o acabamento, rugosidade, interações hidrofóbicas, estabilidade físico-químicas e etc., interferem significativamente na adesão de células e consequentemente na formação de biofilme (Donlan, 2009; Schlisselberg e Yaron,

2013; Tang et al., 2011). A partir dos dados obtidos no experimento 1, foi realizada uma seleção das amostras capazes de reproduzir os mesmos resultados de formação de biofilme quanto às superfícies e tempo de incubação para a realização do segundo experimento, porém somente 34% destas amostras apresentaram os mesmos resultados em três repetições, o que nos sugere uma inconstância no padrão de produção de biofilme nas amostras de *Salmonella* spp. utilizadas neste trabalho.

A maioria dos bacteriófagos isolados de ambientes de esgoto utilizados neste estudo, foram capazes de reduzir as amostras de *Salmonella* formadoras de biofilme, porém o sorovar Mbandaka não foi afetado por quatro de dez bacteriófagos avaliados, e o sorovar Senftenberg não foi susceptível a ação de nenhum bacteriófago. A resistência apresentada pelo sorovar Senftenberg à ação dos bacteriófagos também foi observada por Wall et al. (2010), que utilizaram amostras de bacteriófagos isolados de esgoto para redução dos sorovares Dublin, Enteritidis, Indiana, Kentucky, Litchfield, Schwarzengrund, Senftenberg e Tenesse, onde somente os sorovares Senftenberg e Kentucky não apresentaram susceptibilidade a ação dos fagos. O uso de bacteriófagos no controle de patógenos vem ganhando cada vez mais espaço, mas sua elevada especificidade pode representar problemas em relação à sua gama de hospedeiros. Dentro de cada espécie de patógenos existem subtipos que precisam ser controlados, portanto um bacteriófago efetivo deve possuir uma gama de hospedeiros não muito estreita e nem muito ampla, um exemplo de fago com uma ótima extensão de hospedeiros é o Felix O1, que apresentou lise em 96-99,5% dos sorovares de *Salmonella*. Uma possibilidade de superar estas limitações está na confecção de coquetéis de bacteriófagos, para aumentar a gama de ação lítica sobre sorovares, inclusive de *Salmonella*. Estes já se provaram eficazes no controle de outros patógenos, como *E. coli* O157:H7 em carne (McIntyre, et al. 2007).

A aplicação do *pool* de bacteriófagos inibiu a formação de biofilmes de *Salmonella* spp. nas três superfícies utilizadas neste estudo, concentrando seu período de ação em 3h. Os biofilmes aderidos ao vidro apresentaram resistência ao tratamento de 6h com o *pool* de bacteriófagos, porém com 9h de ação, os bacteriófagos voltaram a reduzir o biofilme. A diminuição da ação de bacteriófagos sobre amostras de *Salmonella* também foi observada por Andreatti et al. (2007), que avaliaram a habilidade de bacteriófagos isolados de ambiente avícola (CB4Ø) e de uma estação de tratamento de esgoto (WT45Ø) em reduzir *S. Enteritidis* in vitro. Eles observaram que os bacteriófagos CB4Ø e WT45Ø reduziram a recuperação das amostras de *Salmonella* em 1,5 a 5 logs,

respectivamente. Entretanto, após 6h de tratamento o CB4Ø não foi capaz de reduzir a recuperação das bactérias, enquanto que o WT45Ø reduziu a recuperação em mais de 6 logs. Resultados semelhantes foram apresentados por Hosseinidoust et al. (2013), onde observaram que a combinação de dois bacteriófagos conhecidos (P22 e PRD1) foi capaz de controlar a formação de biofilmes de *S. Typhimurium*, diminuindo a frequência de resistência em 1/100, enquanto que o uso dos bacteriófagos P22 e PRD1 separadamente conseguiu reduzir os níveis de biofilme somente por 12h e 24h, respectivamente. Além disso observou-se um período em que a mistura de bacteriófagos deixou de ser efetiva no controle do biofilme, retornando sua ação com 72h de tratamento. Entre as hipóteses sugeridas pelos autores para explicar a ausência de ação neste período está o surgimento de uma resistência momentânea, onde as bactérias que se tornaram resistentes favorecerão a seleção de bacteriófagos capazes de se adaptar a esta mutação, gerando uma vantagem seletiva e o aumento do espectro de ação dos fagos, e consequentemente resulta no retorno da ação sobre o biofilme (Comeau e Krisch, 2005). Porém, outra explicação sobre este mesmo evento está na liberação e acúmulo de DNA extracelular bacteriano, liberado no momento da lise mediada por bacteriófagos, tais substâncias seriam responsáveis pelo aumento dos níveis de biofilme no período (Gödeke et al., 2011). Este estudo apresenta a importância de uma abordagem específica quanto a superfície de contato com o alimento e o organismo envolvido na contaminação, pois ambos são capazes de interferir na permanência de microrganismos em ambientes industriais através da produção de biofilmes, sendo assim a fagoterapia apresenta-se como um método alternativo para uma abordagem mais específica e consequentemente mais segura, porém a sua utilização ainda necessita de mais estudos a fim de se conhecer sua interação com o organismo e o ambiente para que ela se torne uma ferramenta comercialmente viável.

REFERÊNCIAS

- Andreatti Filho, R.L., Higgins, J.P., Higgins, S.E., Gaona, G., Wolfenden, a D., Tellez, G., Hargis, B.M., 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar enteritidis in vitro and in vivo. *Poult. Sci.* 86, 1904–1909.
- Arnold, J.W., Bailey, G.W., 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult. Sci.* 79, 1839–1845.
- Bridier, a., Sanchez-Vizuet, P., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naïtali, M., Briand, R., 2014. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178. doi:10.1016/j.fm.2014.04.015
- Comeau, A.M., Krisch, H.M., 2005. War is peace - Dispatches from the bacterial and phage killing fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 488–494. doi:10.1016/j.mib.2005.06.004
- Donlan, R.M., 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.* 17, 66–72. doi:10.1016/j.tim.2008.11.002
- Elhariry, H.M., 2011. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. *Food Microbiol.* 28, 1266–1274. doi:10.1016/j.fm.2011.05.004
- Gödeke, J., Paul, K., Lassak, J., Thormann, K.M., 2011. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME J.* 5, 613–626. doi:10.1038/ismej.2010.153
- Hosseinidoust, Z., Tufenkji, N., van de Ven, T.G.M., 2013. Formation of biofilms under phage predation: considerations concerning a biofilm increase. *Biofouling* 29, 457–68. doi:10.1080/08927014.2013.779370
- Kottwitz, L.B.M., De Oliveira, T.C.R.M., Alcocer, I., Farah, S.M.D.S.S., Abrahão, W.S.M., Rodrigues, D.D.P., 2010. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci. - Heal. Sci.* 32, 9–15. doi:10.4025/actascihealthsci.v32i1.6340
- Lapidot, A., Romling, U., Yaron, S., 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 229–233. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.012
- Møretrø, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K., Langsrud, S., 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1005–1012. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04067.x
- portalsaude.saude.gov.br...dta-brasil-completo.pdf, [s.d.].

- Prouty, a M., Schwesinger, W.H., Gunn, J.S., 2002. Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp . Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp . Society 70. doi:10.1128/IAI.70.5.2640
- Scher, K., Romling, U., Yaron, S., 2005. Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on. Society 71, 1163–1168. doi:10.1128/AEM.71.3.1163
- Schlisselberg, D.B., Yaron, S., 2013. The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. Food Microbiol. 35, 65–72. doi:10.1016/j.fm.2013.02.005
- Shi, X., Zhu, X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends Food Sci. Technol. 20, 407–413. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.054
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Sci. Technol. 43, 573–583. doi:10.1016/j.lwt.2009.12.008
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S. Do, 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control 31, 572–585. doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., Švabić-Vlahović, M., 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Lett. Appl. Microbiol. 38, 428–432. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J. Microbiol. Methods 40, 175–179. doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6
- Strauch, E., Hammerl, J. a., Hertwig, S., 2007. Bacteriophages: New tools for safer food? J. fur Verbraucherschutz und Leb. 2, 138–143. doi:10.1007/s00003-007-0188-5
- Tang, J.N., Kang, M.S., Chen, H.C., Shi, X.M., Zhou, R., Chen, J., Du, Y.W., 2011. The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. Sci. China Life Sci. 54, 863–869. doi:10.1007/s11427-011-4195-5
- Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. J. Appl. Microbiol. 109, 1117–1131. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x
- Winkelströter, L.K., Teixeira, F.B.D.R., Silva, E.P., Alves, V.F., De Martinis, E.C.P., 2014. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. Microb. Ecol. 68, 35–46. doi:10.1007/s00248-013-0347-4
- www.cdc.gov_nationalsurv...urveillOverview_508.pdf, [s.d.].

CAPÍTULO 3

3.1. CONCLUSÕES GERAIS

Com o aumento da busca por alimentos que não ofereçam riscos à saúde, que sejam inócuos e livres de resíduos químicos, a produção de alimentos se tornou cada vez mais rigorosa quanto aos padrões de higiene e segurança que os produtos podem oferecer aos consumidores. O conhecimento do agente e seu subtipo, a abordagem diferenciada de higienização para cada tipo de superfície industrial, bem como a ferramenta utilizada para controle antimicrobiano são essenciais. Algumas superfícies são capazes de favorecer a permanência de bactérias no ambiente sob a forma de biofilme, e no caso da *Salmonella*, alguns sorovares também apresentam diferenças quanto sua produção de biofilme, indicando que as abordagens no momento da higienização também devem ser diferenciadas para cada superfície e patógeno envolvido. Novas abordagens surgiram para auxiliar no combate de biofilmes, e o uso da fagoterapia tem potencial para se desenvolver como um método alternativo no controle destas estruturas em ambientes industriais. Entretanto, o conhecimento dos mecanismos de interação entre os fagos e as bactérias inseridas em biofilmes é necessário para que a fagoterapia seja uma ferramenta confiável e segura como agente antimicrobiano.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREATTI FILHO, R. L.; HIGGINS, J. P.; HIGGINS, S.E.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B. M. Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis In Vitro and In Vivo, *Poultry Science*, v. 86, p. 1904–1909, 2007.

AYEBAH, B.; HUNG, Y-C. Electrolyzed water and its corrosiveness on various surface materials commonly found in food processing facilities. *Journal of Food Process Engineering*, v. 28, p. 257-264, 2005.

BAUMANN, A. R.; MARTIN, S. E.; FENG, H. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of Food Protection*, v. 72, n. 6, p. 1306-1309, 2009.

BREYERS, J. D.; RATNER, J. P. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News*, v. 70, p. 232-237, 2004.

BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M.; PIARD, J-C. C.; NAÏTALI, M.; BRIANDET, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiology*, v. 45, p. 167-178, 2015.

BIER, O. *Microbiologia e Imunologia*. 23º. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. 1234p.

BUCKET, E.; DEMIRHAN, B.; ONURDAG, F. K.; OZGACAR, Ö.; OKTEM, A. B. Antimicrobial and antibiofilm effects of selected food preservatives against *Salmonella* spp. isolated from chicken samples. *Poultry Science*, v. 93, p. 695-701, 2014.

BYUN, M. W.; KIM, J. H.; KIM, D. H.; KIM, H. J.; Jo, C. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. *Food Microbiology*, v. 24, p. 544-548, 2007.

Centers of Disease Control and Prevention (CDC), Estimates of Foodborne Illness in the United States, 2013. Disponível em> <http://www.cdc.gov/foodborneburden#> Acessado em 14 de outubro de 2014.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*, v. 23, p. 250-259, 2006.

CHEN, L.; WEN, Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*, v. 3, p. 66-73, 2011.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 2, p. 22-32, 2003.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DEEP, A.; CHAUDHARY, U.; GUPTA, V. Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. *Journal of laboratory physicians*, v. 3, n. 1, p. 4-11, 2011.

DONLAN, R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*, v. 17, n. 2, p. 66-72, 2009.

EFSA Journal. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2010. v. 10 (2597), n. 3, 2012.

FIORENTIN, L.; VIEIRA N.D.; BARIONI JÚNIOR, W. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*, v.34, p.258-263, 2005.

FU, W.; FOSTER, T.; MAYER, O.; CURTIN, J. J.; LEHMAN, S. M.; DONLAN, R. M. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 1, p. 397-404, 2010.

GIAOURIS, E; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MØRETRØ, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, v. 97, p. 298-309, 2014.

GIAOURIS, E. D.; NYCHAS, G. E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, v. 23, p. 747-752, 2006.

GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. v. 87, p. 41–48, 1999.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; McBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 98S-110S, 2002.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections, *Cellular Microbiology*, v.11, p. 1034–1043, 2009.

HANLON, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 118-128, 2007.

HEYNDRIKX, M.; VANDEKERCHOVE, D.; HERMAN, L.; ROLLIER, I.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER L. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*, v. 129, p. 253-265, 2002.

HUR, J.; KIM, J.; PARK, J.; LEE, Y.; LEE, J. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. *The Veterinary Journal*, v. 189, p. 306–311, 2011.

JONAS, K.; TOMENIUS, H.; KADER, A.; NORMARK, S.; RÖMLING, U.; BELOVA, L. M.; MELEFORS, O. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology*, v. 7, n. 70, p. 1-9, 2007.

LATASA, C.; ROUX, A.; ARANA, A. T.; GHIGO, J. M. M.; GAMAZO, C.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, v. 58, n. 5, p. 1322-1339, 2005.

KOLTER, R.; GREENBERG, E. P. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*, v. 441, p. 300-302, 2006.

MATSUZAKI, S.; RASHEL, M.; UCHIYAMAM, J.; SAKURAI, S.; UJIHARA, T.; KURODA, M.; IKEUCHI, M.; TANI, T.; FUJIEDA, M.; WAKIGUCHI, H.; IMAI, S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother*, v. 11, p. 211–219, 2005.

MAYR, A.; GUERREIRO, M. G. *Virologia Veterinária*. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1981.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde - SVS. Dados Epidemiológicos - DTA - Período de 2000 a 2013. Available at: www.saude.gov.br/svs. Accessed 04.10.14.

PARASION, S.; KWIATEK, M.; GRYKO, R.; MIZAK, L. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish Journal of Microbiology*, v. 63, p. 137-145, 2014.

RITTER, A. C.; TONDO, E. C. Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travellers. *J Infect Dev Ctries*, v. 3, n. 3, p. 254-257, 2014.

SHARMA, M., J.; RYU, M.; L. R. BEUCHAT, L. R. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J. Appl. Microbiol*, v. 99, p.449–459, 2005.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M.J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. *Proceedings of the international conference processes in biofilms: Fundamentals to applications*, Davis, CA, USA, p.58–62, 2009.

SKLAR, I. B.; JOERGER, R. D. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. *J. Food Safety*, v. 21, p. 15–29, 2001.

SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, v. 43, p. 793–808, 2002.

VAZ, C. S. L.; STRECK, A. F.; MICHAEL, G. B.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, D. P.; dos REIS, E. M. F.; CARDOSO, M. R. I.; CANAL, C. W. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poultry Science*, v. 89, p. 1530-1536, 2010.

World Health Organization [2013]. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>. Acessado em: 26/04/2015.

Link para consulta do *Guide for Authors* da revista para publicação *International Journal of Food Microbiology*:

<http://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-food-microbiology/0168-1605/guide-for-authors>