

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES E DAS CONDIÇÕES
HIGIÊNICO-SANITÁRIAS EM SUPERFÍCIES DE CONTATO COM
ALIMENTOS EM SALA DE CORTES DE MATADOURO DE AVES**

LAURA BEATRIZ RODRIGUES

PORTO ALEGRE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES E DAS CONDIÇÕES
HIGIÊNICO-SANITÁRIAS EM SUPERFÍCIES DE CONTATO COM
ALIMENTOS EM SALA DE CORTES DE MATADOURO DE AVES**

Autora: Laura Beatriz Rodrigues

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, na especialidade de Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Porto Alegre

2009

R696a Rodrigues, Laura Beatriz

Avaliação da formação de biofilmes e das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de cortes de matadouro de aves./ Laura Beatriz Rodrigues. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

115 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. Vladimir Pinheiro do Nascimento, Orient.

1. Sanitização: alimentos 2. Biofilmes bacterianos 3. Alimentos: contaminação: microbiologia: higiene I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, Orient. II. Título

CDD 619.471

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

LAURA BEATRIZ RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES E DAS CONDIÇÕES
HIGIÊNICO-SANITÁRIAS EM SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS
EM SALA DE CORTES DE MATADOURO DE AVES

Aprovada em 30 de ABRIL de 2009.

APROVADA POR



Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão



Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira
Membro da Comissão (Externo à UFRGS)



Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo
Membro da Comissão (Externo ao PPGCV)



Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão (PPGCV)

*Aos meus pais, José e Nair,
às minhas irmãs, Mônica e Ligia,
aos meus avós Maria da Graça e José, Clarice e Valdomiro.
Por tudo que vivemos, pelo amor
e pelas dificuldades que nos fizeram crescer.
Mesmo longe, ou nem estando mais aqui, vocês estão sempre junto,
pois ficam do lado de dentro, atrelados ao meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado marido, Fernando Pilotto, pelas calorosas “discussões técnico-científicas” que sempre engrandeceram o trabalho, e que são sua característica pessoal. Pelo incentivo, dedicação, auxílio, por compreender minhas ausências, me apoiar nos momentos de maiores dificuldades e anseios e por ser meu grande companheiro de todas as horas, me amando e me aceitando como realmente sou.

À minha amiga e irmã, Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos. Não existem palavras para agradecer quando se tem como amiga uma pessoa que deixa sua família, suas dificuldades pessoais de lado, para lhe ajudar. Pelo apoio e estímulo constantes e incondicionais, pelas inúmeras vezes que a interrompi no computador ou em sua casa para me esclarecer dúvidas, por cada chimarrão, pelos sorrisos que dividimos, por existir na minha vida, muito obrigada.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento. Por ser um exemplo de pessoa e de profissional, conciliando atividades acadêmicas e administrativas, representando nosso país em entidades nacionais e internacionais, divulgando o conhecimento científico brasileiro, merece grande admiração. Agradeço pela orientação, estímulo, apoio, amizade, e por confiar na minha capacidade desde que nos conhecemos.

Aos meus eternos bolsistas e “filhos”, Natalie Nadin Rizzo e Vinícius Zancanaro Tagliari, pelos feriados, fins de semana, noites, madrugadas e dias normais (claro!) que passamos juntos. Obrigada pelo apoio, por todos os momentos, pelas trocas de ensinamentos, pelas alegrias que vocês me trouxeram e por podermos participar mais a fundo da vida um do outro, transformando uma relação que seria “simplesmente acadêmica” em uma linda amizade. Adoro muito vocês!

À querida equipe do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo (UPF), aos atuais e antigos funcionários e estagiários, principalmente Amauri Picollo de Oliveira, Ariane Remor, Daiane Ferreira, Franciane Goetz, Graciela Trenhago, Isabel Cristina Cisco, Joelisa Castanha, Jucenara Soares, Keli Hepp, Rafael Marcanzoni, Robson Dupont Rohr, pelo fundamental apoio nesta pesquisa e, o mais importante, por manterem a qualidade da prestação de serviços em todos os momentos, especialmente durante minha ausência.

À toda equipe do Centro de Pesquisa em Alimentação (Cepa) da UPF, principalmente ao Coordenador Prof. Dr. Jorge Gruhn Schulz, pelo apoio e

compreensão, ao colega Sílvio Cezar Rodegheri, pelo apoio técnico, e à querida Mônia Stremel Azevedo, pelo auxílio.

A todos do Curso de Medicina Veterinária da UPF, que muito me ajudaram e me apoiaram, em especial aos amigos Prof. Dr. Eduardo Santiago Ventura de Aguiar, pelo apoio e preocupação, ao Prof. Dr. Elci Lotar Dickel, pelo apoio e incentivo, ao Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos, pelo apoio, incentivo e compreensão, ao Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz, pelo apoio e compreensão, ao Prof. Dr. Maurício Veloso Brun, pelo apoio, carinho e preocupação, à Profa. Stella de Faria Valle, pelo apoio, às efficientíssimas gurias da Secretaria, Lucimara Brotto e Rita De Marco, pelo apoio e auxílio, às queridas funcionárias do Laboratório de Bacteriologia e Micologia Veterinária, Fabiana de Lima, Monique Lorensen, e do Laboratório Multidisciplinar, Ilena Maria Bueno, pelo apoio e carinho recebido, e aos meus queridos alunos, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Nélio José de Andrade, da UFV, por seus cursos, palestras e pesquisas científicas, que inspiraram a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Costa e ao Prof. Dr. Florindo Luiz Castoldi, pela análise estatística e toda atenção dispensada.

Aos Professores Doutores Ari Bernardes da Silva (*in memoriam*), Carlos Tadeu Pippi Salle e Hamilton Luiz de Souza Moraes, do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelos ensinamentos e filosofia de trabalho que me acompanharão por toda a vida.

Ao Prof. Dr. Félix H. D. González, e à secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela colaboração administrativa durante a realização do Doutorado.

À Oficina do Texto Ltda, ao tradutor Gilson Mattos, pelo excelente serviço prestado, sempre com perfeição, dedicação e extremo profissionalismo.

Aos colegas Sabrina Tolotti Fraga e Lair Lizot Chaves, pelo grande auxílio que realizaram, possibilitando a realização da fase experimental no abatedouro de frangos de corte.

À Laborclin - Produtos para Laboratórios Ltda, ao representante técnico Luis Paulo Albreche, pelo financiamento do projeto.

À Madasa do Brasil, à Dra. Vânia Tronco, pelo financiamento do projeto.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

Os procedimentos de higienização nos matadouros de aves consistem fundamentalmente no uso de água quente, detergentes e sanificantes. Embora a água quente e os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir os microrganismos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária. Dentre os contaminantes da carne de aves, microrganismos patogênicos apresentam grande relevância como causadores de doenças veiculadas por alimentos e por terem reflexo econômico. Do ponto de vista da segurança e da degradação de alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à sua dificuldade de remoção. Com base na relevância destes temas, nesta tese constam seis trabalhos científicos. No primeiro trabalho foi avaliada a contaminação bacteriana das superfícies em contato com carne de frango através das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp, *S. aureus* e pesquisa de *Salmonella* sp. Verificou-se que a *E. coli* foi detectada na bancada de aço inoxidável e na esteira sobreposta de “nylon”, *Staphylococcus* sp foi detectado em todas as amostras, *S. aureus* não foi detectado apenas na bancada de aço inoxidável e em uma das esteiras lisas de poliuretano e *Salmonella* sp esteve ausente em todas as superfícies analisadas. No trabalho 2 avaliou-se a formação de biofilme em placas de poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouros avícolas, cultivadas em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose e a hidrofobicidade destas cepas na fase logarítmica (4 h) e na fase estacionária (24 h) do crescimento bacteriano. As *S. Heidelberg* foram capazes de formar biofilmes no poliestireno, com diferentes fontes de nutrientes, sendo fortemente formadoras de biofilme no caldo TSB sem suplementação de glicose, e foram determinadas como altamente hidrofóbicas e com média hidrofobicidade. O terceiro trabalho foi realizado para comparar o uso de swab e esponja para avaliação de superfícies em contato com alimentos em matadouro de aves. Concluiu-se que não houve diferença estatística entre as duas metodologias para a verificação da higienização em superfícies como as bancadas de aço inoxidável, esteiras de poliuretano, esteira sobreposta de “nylon” e placas de polietileno. No

trabalho 4 foi realizada a pesquisa de *Salmonella* sp e *Listeria* sp em diferentes superfícies de contato com alimentos e a verificação da eficácia do processo de sanitização. *Salmonella* sp. não foi isolada em nenhuma das superfícies testadas. Antes da lavagem, isolou-se *Listeria welshimeri* da esteira de poliuretano e *L. monocytogenes* da mesa de aço inoxidável, ambas de superfícies contendo resíduos de alimentos. Após a lavagem com água quente isolou-se *L. monocytogenes* da esteira de poliuretano, sendo que este agente não foi novamente isolado após o tratamento com amônia quaternária a 2%. No trabalho 5 foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias das superfícies de uma sala de cortes de abatedouro avícola, utilizando microbiologia convencional (placas Rodac e esponja) e ATP-bioluminescência, para analisar a efetividade da água quente e da ação de três princípios ativos (ácido peracético, amônia quaternária e biguanida) no processo de higienização, quantificando microrganismos mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e ATP. O método ATP-bioluminescência demonstrou a presença de matéria orgânica em todos os pontos coletados e, assim como a microbiologia convencional, também evidenciou a eficácia da higienização, demonstrando ser um método rápido para a verificação e controle do processo. A utilização das placas Rodac possibilitou uma melhor recuperação de microrganismos que a esponja na quantificação de mesófilos aeróbios, *E. coli* e *S. aureus*. Houve redução da contaminação após o uso da água quente. Quanto aos sanitizantes, após o uso da amônia quaternária e do ácido peracético, em todas as superfícies avaliadas, não houve mais recuperação de *E. coli* e *S. aureus*. No trabalho 6 foi realizada a quantificação da formação de biofilme em poliestireno por *Listeria*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de superfícies de abatedouro avícola. As amostras de *S. aureus* formaram biofilme no poliestireno em pelo menos uma das concentrações testadas, sendo fortemente formadoras em caldo TSB com 2 %, 3 %, 3,5 % e 4 % de glicose. As amostras de *Listeria* demonstraram-se moderadamente formadoras de biofilme em todas as concentrações de glicose testadas, exceto as cultivadas em TSB com 1,5 % glicose, no qual foram não formadoras e fracamente formadoras. Uma amostra, cultivada no caldo TSB com 3,5 % de glicose, foi a única *L. monocytogenes* considerada fortemente formadora de biofilme. As amostras de *E. coli* formaram biofilme em pelo menos uma das concentrações testadas, e foram fortemente formadoras quando cultivadas em caldo TSB com 0 %, 3,5 % e 4 %.

ABSTRACT

Cleaning procedures at poultry slaughterhouses basically include the use of hot water, detergents and sanitizing agents. Although hot water and detergents reduce the bacterial load on surfaces, their main goal is to remove organic and mineral residues. Sanitization, which is the last cleaning step is targeted at reducing the number of microorganisms to safety levels so as to obtain a product of good hygienic and sanitary quality. Among contaminants of poultry meat, pathogenic microorganisms play a key role as causing agents of foodborne diseases and also have a remarkable economic impact. With respect to food safety and degradation, biofilms are important because of their formation on foods, utensils and surfaces and because they cannot be easily removed. Given the relevance of these issues, the present study includes six scientific articles. The first one assessed bacterial contamination of surfaces in contact with poultry meat based on the counting of aerobic mesophiles, total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp, *S. aureus* and investigation of *Salmonella* sp. *E. coli* was detected on stainless steel tables and on the overhead nylon conveyor; *Staphylococcus* sp was detected in all samples; *S. aureus* was not detected only on stainless steel tables and on one smooth polyurethane conveyor, and *Salmonella* sp was not detected in any of the surfaces analyzed. The second article assessed biofilm formation on polystyrene cutting boards by *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry slaughterhouses, grown in TSB at different glucose concentrations, in addition to the hydrophobicity of these strains in the logarithmic phase (4 h) and in the stationary phase (24 h) of bacterial growth. *S. Heidelberg* strains were capable of forming biofilm on polystyrene, at different nutrient concentrations, and turned out to be strong biofilm producers in TSB without glucose supplement, being regarded as highly and moderately hydrophobic. The third article compared the use of swab and sponge in the assessment of surfaces in contact with foods at a poultry slaughterhouse. It concluded that there was no statistical difference between the two methods used to check the cleaning of surfaces such as stainless steel tables, polyurethane conveyors, overhead nylon conveyors and polyethylene cutting boards. Article 4 investigated *Salmonella* sp and *Listeria* sp on different surfaces in contact with foods and the efficacy of the sanitization process. *Salmonella* sp. was not isolated on any of the surfaces analyzed. Before washing,

Listeria welshimeri was isolated from the polyurethane conveyor and *L. monocytogenes* from the stainless steel table, both from surfaces that contained food residues. After hot water washing, *L. monocytogenes* was isolated from the polyurethane conveyor, but this pathogen was not detected again after cleaning with 2% quaternary ammonium. Article 5 assessed the cleaning and hygiene of surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse using conventional microbiological methods (Rodac plates and sponge) and ATP-bioluminescence to assess the effectiveness of hot water and the action of three active ingredients (peracetic acid, quaternary ammonium and biguanide) in the sanitization process, quantifying aerobic mesophilic microorganisms, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and ATP. The ATP-bioluminescence assay revealed presence of organic matter at all sites analyzed and, as with conventional microbiology, it also demonstrated that sanitization was efficacious, proving that it is a quick method for inspecting and controlling the process. The use of Rodac plates allowed for better recovery of microorganisms than the sponge in the quantification of aerobic mesophiles, *E. coli* and *S. aureus*. Contamination was reduced after hot water use. With regard to sanitizing agents, *E. coli* and *S. aureus* were no longer detected on any of the surfaces analyzed after the use of quaternary ammonium and peracetic acid. The last article quantified biofilm formation on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from surfaces at a poultry slaughterhouse. *S. aureus* strains formed biofilm on polystyrene at least at one of the concentrations tested, being strong biofilm producers in TSB with 2, 3, 3.5 and 4% of glucose. *Listeria* strains were moderate biofilm producers at all glucose concentrations, except for those grown in TSB containing 1.5% of glucose, in which they did not form biofilm or were weak producers. One *L. monocytogenes* strain, grown in TSB with 3.5% of glucose, was the only one regarded as strong biofilm producer. *E. coli* strains analyzed formed biofilm at least at one of the concentrations and were strong biofilm producers when grown in TSB with 0, 3.5 and 4% of glucose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4	TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	25
4.1	Trabalho 1.....	25
4.2	Trabalho 2.....	30
4.3	Trabalho 3.....	46
4.4	Trabalho 4.....	49
4.5	Trabalho 5.....	69
4.6	Trabalho 6.....	91
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
	REFERÊNCIAS.....	110

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira, em função da contínua agregação de novas tecnologias, apresenta destacados índices de produtividade, sendo os seus indicadores de produção iguais ou freqüentemente melhores aos encontrados em qualquer outro país do mundo. Seu bom desempenho está fundamentado em um sistema técnico-científico avançado, além da realização de um bom trabalho profissional em todos os níveis de atuação, como produção, comercialização, distribuição e exportação. Essas características não só fazem do Brasil o maior exportador mundial de carnes de frango, mas também permite à população adquirir um produto de boa qualidade a baixo custo.

A boa aceitação dos produtos avícolas brasileiros no mundo se deve principalmente a qualidade microbiológica que apresentam. Desta forma, as empresas avícolas, com o intuito de manter os mercados atuais e conquistar novos consumidores, buscam constantemente aprimorar as condições higiênico-sanitárias em toda a cadeia produtiva. No segmento de abate e processamento dos produtos avícolas, as indústrias brasileiras disponibilizam de um moderno parque industrial, sendo a maioria dos frigoríficos habilitados para exportar carne de aves e seus produtos para os mais exigentes mercados internacionais.

No abate e processamento das aves, o grande desafio atual, principalmente devido às barreiras sanitárias internacionais, é evitar que ocorra contaminação cruzada dos produtos durante sua industrialização. A implementação de programas de qualidade, como boas práticas de fabricação e análise de perigos e pontos críticos de controle, tem contribuído em muito na melhoria das condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos. Contudo, ainda é necessário o aprimoramento destes programas e a implantação de novas tecnologias para garantir a redução de microrganismos patogênicos nos produtos avícolas, para que estas bactérias não causem doenças de origem alimentar.

Neste contexto, pesquisas que abranjam a avaliação das condições higiênico-sanitárias de abatedouros de aves apresentam grande relevância, por auxiliar a indústria

avícola a ter um maior conhecimento das reais condições dos abatedouros de aves no Brasil, levando a um aprimoramento das condições higiênicas destes estabelecimentos. Por este motivo, decidiu-se pela realização do estudo em superfícies em contato com alimentos, em sala de cortes, determinando as placas de corte, as esteiras e as mesas, utilizadas nas linhas de corte de coxa de frango, como objeto de estudo. Foram pesquisados os microrganismos patogênicos *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além da realização da quantificação de microrganismos mesófilos aeróbios, os quais são utilizados rotineiramente na indústria para indicar os níveis de contaminação após a higienização.

Devido à importância cada vez maior da congruência entre a agilidade e a qualidade no processamento das carnes de aves, já que a utilização da microbiologia convencional pode demorar de 24 a 48 horas para a obtenção dos resultados referentes a microrganismos mesófilos aeróbios, os quais auxiliariam em uma decisão referente a uma medida corretiva quanto a uma higienização mal feita, pesquisou-se o uso da quantificação de ATP por bioluminescência, metodologia que proporciona resultados em minutos e possibilita tomada de decisões imediatas.

Em relação aos microrganismos encontrados em superfícies, muitos deles podem estar aderidos e, após esta aderência, podem formar biofilme. A formação de biofilme vem sendo cada vez mais estudada em indústrias de alimentos, devido a sua maior capacidade de resistência ao processo de higienização. Por esta razão, as bactérias recuperadas no abatedouro foram avaliadas em relação a sua capacidade de formação de biofilme em superfície de poliestireno. Também foi avaliada a formação de biofilme e a hidrofobicidade de amostras de *Salmonella* Heidelberg previamente isoladas do mesmo abatedouro avícola onde foi realizado o experimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estruturação da tese

2.1.1. Revisão bibliográfica

Consiste em uma breve revisão geral da literatura englobando aspectos relativos às condições higiênico-sanitárias de abatedouros, biofilmes, microrganismos patogênicos, entre outros, uma vez que cada um dos trabalhos anexados tem sua própria revisão referente ao assunto abordado.

2.1.2. Trabalhos científicos

2.1.2.1. Trabalho 1

"Avaliação microbiológica de superfícies de contato em um matadouro de aves"

Neste trabalho foi avaliada a contaminação bacteriana das superfícies em contato com carne de frango através das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp, *S. aureus*, e pesquisa de *Salmonella* sp.

Publicado – III Congresso Latino Americano de Higienista de Alimentos. Revista Higiene Alimentar, vol. 21, nº 150, abril 2006.

Anexo I: Documento de comprovação da publicação do trabalho.

2.1.2.2. Trabalho 2

"Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola"

Neste estudo foi avaliado a formação de biofilme em placas de poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola e cultivadas em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose, e avaliada a hidrofobicidade destas cepas em diferentes tempos de incubação: no início da fase logarítmica (4 horas) e na fase estacionária (24 horas).

Aceito para publicação: Acta Scientiae Veterinariae.

Anexo II: Documento de comprovação de aceitação do trabalho para publicação.

2.1.2.3. Trabalho 3

"Comparação do uso de swab e de esponja para avaliação das condições higiênico-sanitárias da sala de corte de um matadouro de aves"

Neste trabalho foi avaliada as condições higiênico-operacionais de superfície de contato com alimentos em uma sala de cortes de abatedouro avícola, para comparar duas metodologias de esfregação: *swabs* e esponjas, para avaliar a efetividade da higienização operacional.

Publicação: VIII Mostra de iniciação científica. Área: Ciências Agrárias – Microbiologia de alimentos. Universidade de Passo Fundo.

Anexo III: Documento de comprovação da publicação do trabalho.

2.1.2.4. Trabalho 4:

"Investigation of *Salmonella* sp and *Listeria* sp from stainless steel, polyurethane and polyethylene surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse"

Este estudo investigou a presença de *Listeria* e *Salmonella* em superfícies de sala de corte de abatedouro avícola e a eficácia do processo de higienização utilizado.

Públicação: Trabalho submetido para Brazilian Journal of Microbiology.

Anexo IV: Documento de envio do trabalho.

2.1.2.5. Trabalho 5

"ATP-Bioluminescência e microbiologia convencional (placas Rodac e esponja) na avaliação das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de cortes de matadouro de aves"

Neste estudo foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias das superfícies das mesas de aço inoxidável, esteiras de poliuretano e placas de polietileno de uma sala

de cortes de abatedouro avícola, utilizando a microbiologia convencional, por placas Rodac e esponja, e ATP-bioluminescência, para analisar a efetividade da água quente e da ação de três princípios ativos (ácido peracético, amônia quaternária e biguanida) no processo de higienização, quantificando microrganismos mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e ATP.

Publicação: A ser enviado para publicação

2.1.2.6. Trabalho 6:

"Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse"

Neste trabalho foi observada a formação de biofilme em placas de poliestireno por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *L. welshimeri* isolados em sala de corte de um abatedouro avícola.

Publicação: Trabalho submetido para publicação na Brazilian Journal Microbiology

Anexo V: Documento de submissão do trabalho.

2.1.3. Considerações finais

Abordagem dos principais aspectos referentes aos trabalhos da tese.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil, atualmente, lidera as exportações de carne de frango no mundo. As exportações de carne de frango encerraram 2007 com embarques de 3,3 milhões de toneladas, um aumento de 21% em relação a 2006. A receita cambial somou quase US\$ 5 bilhões, o que corresponde a um aumento de 55% sobre o ano anterior. Com este desempenho, as exportações de carne de frango atingiram em 2007 um recorde na história do setor (ABEF, 2009).

O agronegócio avícola brasileiro movimenta em torno de 10 bilhões de dólares ao ano, representando 2% do PIB do país. Emprega cerca de 2 milhões de pessoas em suas atividades diretas e indiretas e tem crescido a uma taxa de cerca de 10% ao ano, nas três últimas décadas (MENDES; SALDANHA, 2004). No Estado do RS, a avicultura é responsável por 45.000 empregos diretos e 800 mil empregos indiretos, ajudando, desta forma, não somente a geração de empregos nas cidades, mas também a fixação de mão de obra no campo. Atualmente são mais de 8.500 famílias de produtores integrados de frango de corte que trabalham neste segmento agropecuário (ASGAV, 2009).

O bom desempenho da avicultura brasileira está fundamentado em um sistema técnico-científico avançado, além da realização de um bom trabalho profissional em todos os níveis de atuação, como produção, comercialização, distribuição e exportação. Essas características, não só fazem do Brasil o maior exportador mundial de carnes de frango, mas também permite à população adquirir um produto de boa qualidade a baixos custos (FURLAN, 2000).

A indústria avícola brasileira, em função da contínua agregação de novas tecnologias, apresenta destacados índices de produtividade, sendo que seus indicadores de produção são iguais ou frequentemente melhores aos encontrados em qualquer outro país do mundo (SALLE; SILVA, 2000).

Contudo, com a globalização dos mercados, a rentabilidade tem diminuído ao longo do tempo, o que tem levado o setor a buscar a maximização da eficiência no processo produtivo. Para tanto, a incorporação constante de novas tecnologias em todas as áreas, tem se tornado fundamental para a sobrevivência da atividade. Ao mesmo tempo, a manutenção deste posto exige uma grande necessidade de manutenção da sanidade dos plantéis avícolas e, também, das condições higiênico-sanitárias dentro dos abatedouros.

O procedimento de higienização nos matadouros de aves consiste fundamentalmente no uso de água quente, detergentes e sanificantes. Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir microrganismos alteradores e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (MORAES et al, 1997). Numa indústria de produtos de origem animal, em especial a indústria de carnes e derivados, a limpeza e sanitização é pratica de extrema importância no sentido de evitar-se ações dos fatores causadores da contaminação dos alimentos, que levam à perda das suas qualidades organolépticas e nutricionais, bem como a sua degradação, que pode ocasionar enfermidades de maior ou menor gravidade ao homem (PARDI et al., 2001).

A atividade biológica de cerca de 500 agentes químicos pertencentes às séries da biguanida com os grupamentos substituídos tem sido avaliadas desde 1950, encontrando-se entre eles, vários membros com ação letal sobre bactérias, fungos e vírus, que levaram à síntese química de uma série de derivados da bisbiguanida (ANDRADE; MACEDO, 1996). Os compostos de amônia quaternária (*quats*) são largamente utilizados como anti-sépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbiocida (McDONELL; RUSSEL, 1999). Os *quats* têm um alto poder bacteriostático, potencializado pela formação de filmes ou películas sobre a superfície, com poder residual longo por mais lisas que sejam estas superfícies (WIEST, 1984). O ácido peracético é um sanitizante que possui algumas vantagens, como não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, ter baixo impacto ambiental e ser relatado como eficaz contra biofilmes (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Dentre os contaminantes da carne de aves, microrganismos patogênicos apresentam grande importância, por possuírem relevância como causadoras de doenças

veiculadas por alimentos e, conseqüentemente, terem reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações.

As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre outros. A contagem padrão em placa tem sido utilizada como um indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação (SILVA et al., 1997; CARDOSO et al., 2000). Contagens altas indicam uma matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção, e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (SIQUEIRA, 1995).

O gênero *Escherichia*, juntamente com outras bactérias fermentadoras da lactose da família *Enterobacteriaceae*, como as dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme (FRAZIER, 1976; SILVA; JUNQUEIRA, 1995). O habitat das bactérias que pertencem ao grupo coliforme é o trato intestinal do homem e de outros animais, entretanto, podem persistir por longos períodos e se multiplicarem em ambientes não fecais (PARDI et al., 1995; JAY, 2005). O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas; altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpezas e sanificações deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem. O índice de coliformes fecais é empregado como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias deficientes, levando-se em conta que a população deste grupo é constituída principalmente por uma alta população de *E. coli*, podendo também indicar outros patógenos internos (DELAZARI, 1998; PARDI et al., 1995; SIQUEIRA, 1995). Em geral as bactérias do grupo coliformes são prejudiciais para os alimentos, onde sua presença determina a inutilidade dos mesmos (FRAZIER, 1976). O grupo de coliformes é constituído de uma microbiota que freqüentemente está associada à carne de aves. Dentre elas, a *E. coli* normalmente alcança populações de 100 UFC/g da carcaça sob condições normais de obtenção (DELAZARI, 1998).

O *Staphylococcus aureus* é um mau competidor, pode ser transmitido pela manipulação, e apresenta grande risco nos alimentos em que a microbiota normal foi destruída ou inibida, como em carnes defumadas ou salgadas, e a má conservação de alimentos em altas temperaturas é uma das principais causas das intoxicações por *Staphylococcus* (Rode et al., 2007).

Listeria monocytogenes é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, freqüentemente encontrada em produtos cárneos. Esse patógeno é o agente da listeriose, uma infecção alimentar atípica que apresenta alta taxa de mortalidade, período de incubação longo e predileção por pacientes que tenham condições imunológicas deficitárias (SILVA et al., 2004). Embora as carnes frescas apresentem, geralmente, baixas contagens de *L. monocytogenes*, a medida que aumenta seu grau de processamento, aumenta o risco de contaminação (JAY, 1996). Pelisser et al. (2001) avaliaram a ocorrência de *Listeria* sp em carcaças refrigeradas de frango, comparando-se a metodologia convencional recomendada pelo FDA, modificada pela introdução de uma segunda etapa de enriquecimento antes do plaqueamento, e o método rápido Clearview™ (Oxoid®). Foram analisadas 48 carcaças de frango de diferentes marcas e supermercados de Florianópolis, Brasil, e a *Listeria* sp foi encontrada em 21 (43,7%) amostras.

A *Salmonella* é o mais importante microrganismo em surtos associados a carne de aves (DELAZARI, 1998). Em muitos países, produtos à base de ovos e carne de frango constituem-se nas principais causa de enterite humana onde regularmente são registrados surtos envolvendo *Salmonella* (MEAD, 1989). É considerado um dos enteropatógenos humanos mais freqüentemente associados à microbiota entérica das aves, originando-se de diferentes fontes do ambiente avícola (CARDOSO et al., 2000).

Normalmente, as carcaças contaminadas com *Salmonella* sp. apresentam pequeno número de bactérias (< 100 UFC/carcaças de ave), a menos que ocorra conservação inadequada, em altas temperatura, o que pode ter, como consequência, uma intensa multiplicação (INGRAM; SIMOSEN, 1990; MEAD, 1989).

A indústria avícola nacional desenvolve atualmente grandes esforços para a implantação de programas de qualidade na área de sanidade, a fim de se adequar às exigências dos mercados externos, cada vez mais inflexíveis quanto a esse aspecto. Em âmbito nacional, se observa também uma conscientização crescente por parte do consumidor em relação às exigências de qualidade sanitária dos produtos avícolas oferecidas no mercado, principalmente em relação à *Salmonella*.

Do ponto de vista da segurança e da degradação de alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à sua dificuldade de remoção. Os biofilmes em condições naturais tendem a ser compostos por culturas mistas, e são considerados mais resistentes aos produtos utilizados comumente para limpeza e sanificação. A presença de biofilmes de culturas mistas

também predispõe a ocorrência de microrganismos patogênicos, os quais podem se aderir a essa superfície. (JAY, 2005; FORSYTHE, 2002).

Um biofilme consiste no crescimento de bactérias, fungos ou protozoários, de modo isolado ou em combinação, ligados por uma matriz extracelular, presa a sólidos ou superfícies sólidas. A adesão é facilitada pela excreção microbiana de uma matriz de exopolissacarídeos, muitas vezes referida como glicocálix. Nesse microambiente são formadas microcolônias e canais de água utilizados para o transporte de nutrientes e produtos tóxicos. As células microbianas suspensas em líquidos, que não estão em biofilmes, apresentam-se em estado de livre flutuação, denominado planctônico (JAY, 2005).

A adesão bacteriana pode ser dividida em dois estágios, primária e secundária. O primeiro estágio é reversível e é determinado por variáveis físico-químicas, como as interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas, que vão determinar a adesão entre as duas superfícies, a célula bacteriana e a superfície de interesse. Na adesão secundária ocorre uma mediação molecular entre adesinas específicas e superfície. O microrganismo consolida sua adesão através da produção de um complexo exopolissacarídeo e/ou ligando receptores específicos presentes nas pílulas com a superfície do material. No final deste estágio a adesão é irreversível (COSTERTON et al., 1995).

Existe uma heterogeneidade química dentro do biofilme, fazendo com que haja, dentro de uma mesma comunidade, diferentes estágios de crescimento e de atividade metabólica. As diferenças nas concentrações de oxigênio, devido à sua limitação na penetração no biofilme, também influenciam nas taxas de desenvolvimento das bactérias pertencentes à comunidade (WERNER et al., 2004). Werner et al. (2004) puderam observar, também, que a atividade de síntese protéica é proporcional à quantidade de oxigênio que consegue penetrar no biofilme.

Essa comunidade de microrganismos sésseis se caracteriza por células que se aderem a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos, e exibem um fenótipo alterado quanto ao seu crescimento, expressão gênica e produção de proteínas (DONLAN; COSTERTON, 2002). As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Estudos mostram que a

adesão microbiana se torna melhor com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Componentes da superfície celular promovem (hidrofobinas) ou reduzem (hidrofilinas) as propriedades que podem coexistir na superfície bacteriana, podendo ocorrer alterações na estrutura da matriz de exopolissacarídeos durante a curva de crescimento (ROSEMBERG et al., 1986). Pôde-se observar que, nas amostras avaliadas, houve grande alteração do índice de hidrofobicidade em relação ao tempo de incubação. Entretanto, outros fatores podem alterar estes resultados, como o hidrocarboneto utilizado. Neste sentido, Rosemberg et al. (1980) testou diferentes microrganismos frente ao xileno, octano e hexadecano, obtendo variações nos resultados quanto ao volume de hidrocarboneto e bactéria avaliada.

Embora múltiplas bactérias e fatores externos influenciem a adesão e acúmulo, a melhor forma de compreender o mecanismo de biofilmes em bactérias como os staphylococci é a produção de uma adesina polissacarídica extracelular, “termed polysaccharide intercellular adhesin” (PIA) ou “polymeric N-acetyl-glucosamine” (PNAG) por enzimas codificadas pelo operon *ica*. Modificações no ambiente bacteriano pela adição de cloreto de sódio ou etanol no meio de crescimento podem ativar o operon *ica* via caminhos regulatórios distintos em um tipo *icaR*-dependente. O desenvolvimento de biofilmes em isolados de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes é primariamente glicose-induzidos e aparentemente envolve uma proteína adesina. Estes dados revelam um nível previamente desconhecido de complexidade de ambos mecanismos e regulação de biofilme em *S. aureus*, os *ica*-dependentes e os *ica*-independentes (O’Gara, 2007). O gene *rbf* em *S. aureus* é requerido pelo desenvolvimento de biofilmes em meios com glicose ou cloreto de sódio, com expressão não regulada pelo operon *ica*. A formação de biofilmes pode ser afetada por condições ambientais relevantes para a indústria alimentícia, como temperatura, cloreto de sódio, glicose e etanol. A presença combinada de cloreto de sódio e glicose aumenta a formação de biofilme (Rode et al., 2007).

A conjugação bacteriana promove a transferência horizontal de material genético entre doadores e células receptoras pelo contato físico, sendo um fenômeno de consequência evolucionária fundamental. Biofilmes são perfeitamente adequados a troca de material genético de várias origens, e tem sido demonstrado que a conjugação bacteriana ocorre dentro de biofilmes. Plasmídios conjugativos naturais expressam

fatores que induzem bactérias planctônicas a formar ou entrar em comunidades de biofilmes (Ghigo, 2001).

A avaliação da formação e presença de biofilme em superfícies de ambientes de processamento de alimentos, como aço inoxidável, borracha, polietileno, polipropileno, entre outros, tem sido estudada através do uso de diferentes metodologias (Parizzi et al, 2004). Jessen; Lammert (2003) avaliou o ambiente de processamento de carnes, após a higienização, realizando a contagem total de microrganismos aeróbios. Para tanto, as coletas, em áreas semelhantes, foram realizadas através de duas metodologias; na primeira delas a superfície foi raspada antes da fricção com o *swab*; na segunda metodologia o *swab* entrava em contato com a superfície e era friccionado três vezes consecutivas. Neste trabalho evidenciou-se que a segunda metodologia era a mais adequada para comprovar a presença de biofilme em superfícies.

A sensibilidade das bactérias aos sanitizantes de uso comum em indústrias de alimentos, quando estas compõem um biofilme, muitas vezes difere da encontrada em testes com células planctônicas. Em trabalho realizado por Joseph et al (2001), que avaliou a formação de biofilme de *Salmonella* em aço inoxidável, plástico e cimento, o substrato que teve a menor formação de biofilme foi o aço inoxidável, com 3×10^5 UFC/cm². Também foi avaliada a ação de sanitizantes sobre biofilmes e células planctônicas, havendo grande diferença entre os resultados obtidos, com o biofilme apresentando uma resistência muito maior. Evidenciou-se, então, a necessidade de procedimentos de limpeza feitos de forma criteriosa em ambientes produtores de alimentos, já que somente o uso de sanitizantes em biofilmes íntegros não apresentou bons efeitos.

Não existe um método prático para a quantificação de microrganismos em biofilmes no ambiente de uma indústria de alimentos. Isto ocorre porque *swabs* e esponjas não destacam quantitativamente a microflora que está firmemente aderida. Entretanto, amostragens por *swabs* e esponjas são informações úteis em relação ao crescimento microbiano na superfície e a grau de fetividade da higienização (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003)

Uma das formas de verificar a eficácia dos procedimentos de limpeza é o uso do método de placas Rodac (“replicate organism detection and counting”), que permite a replicação de organismos diretamente em ágar após contato com a superfície e emprega placas especiais que possuem um nível elevado de ágar (Jay, 2005). As placas Rodac podem ser utilizadas em um programa de monitoramento e verificação para determinar

se os níveis bacterianos de superfícies lisas e não porosas estão em limites seguros. A utilização deste método é aconselhada principalmente após a sanitização, quando as superfícies se encontram com menor contaminação, propiciando a leitura das placas após incubação (SNYDER, 2003).

Testes usando ATP-bioluminescência são largamente aceitos como método de monitoria do *status* higiênico-sanitário de linhas de produção de alimentos. A técnica de ATP-bioluminescência detecta células microbianas e resíduos de alimentos, os quais podem persistir após uma limpeza inadequada e ser uma origem de nutrientes para o crescimento microbiano (CORBITT et al., 2000).

Métodos rápidos baseados no crescimento bacteriano e metabolismo têm sido desenvolvidos usando os princípios da ATP-bioluminescência, biofísica, radiometria e impedância. Este ensaio detecta a quantidade de ATP em superfícies de contato no processamento de alimentos bem como da própria amostra a ser analisada. O ATP detectado por esta técnica é derivado de microrganismos, células somáticas, plantas e animais, e vários equipamentos que usam os princípios da ATP-bioluminescência estão disponíveis comercialmente. O ATP reage com o complexo enzimático luciferina-luciferase e a luz emitida é medida por um luminômetro e a expressa em unidades relativas de luz (URL). Este método oferece resultados em tempo real, permitindo tomar ações imediatamente, como higienizar novamente as superfícies antes da utilização (COSTA et al. 2006).

Costa et al. (2006), usaram a técnica do ATP-bioluminescência para avaliar os procedimentos de higienização de superfícies em aço inoxidável dos tanques de transporte de leite cru, de estocagem de leite cru resfriado, de equilíbrio de um pasteurizador, de estocagem de leite pasteurizado e para embalagem de leite pasteurizado e, ainda, a superfície interna de uma centrífuga de leite quanto à determinação de ATP (URL.cm⁻²) e da contagem de mesófilos aeróbios (UFC.cm⁻²). A técnica do ATP-bioluminescência indicou que 100% das superfícies estavam em condições higiênicas inadequadas, enquanto a contagem bacteriana indicou que apenas 50% estavam de acordo com as recomendações da APHA e 33% de acordo com a OMS.

4 TRABALHOS CIENTÍFICOS

4.1 TRABALHO 1

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SUPERFÍCIES DE CONTATO EM UM MATADOURO DE AVES

Microbiological evaluation of surfaces in poultry slaughter

RODRIGUES, L. B.^{1,2}; SOARES, J.²; CAMARGO, C. B.²; TRENHAGO, G.²;
OLIVEIRA, A. P.²; ORSATO, J.²; TAGLIARI, V. Z.²; RIZZO, N. N.²; FRAGA, S. T.³;
SANTOS, L. R.²; NASCIMENTO, V. P.¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – FAVET / UFRGS

² Centro de Pesquisa em Alimentação – Cepa / UPF

³ Médica Veterinária, autônoma.

Palavras-chave: swab, superfícies, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella*.

INTRODUÇÃO

A indústria avícola brasileira tem apresentado, nos últimos anos, altos índices de produtividade, sendo o Brasil o maior exportador mundial de carne de frango. Ao mesmo tempo, a manutenção deste posto exige a sanidade dos plantéis avícolas e das condições higiênico-sanitárias dentro dos abatedouros. Dentre os contaminantes da carne de aves, microrganismos patogênicos apresentam grande importância, por possuírem relevância como causadores de doenças veiculadas por alimentos, e terem reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação bacteriana das superfícies em contato com carne de frango através das contagens de: microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp*, *S. aureus*; e pesquisa de *Salmonella sp*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na sala de cortes de um matadouro de aves do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentação (Cepa) da Universidade de Passo Fundo (UPF). As amostras foram coletadas durante o processamento, em três linhas para cortes de peito de frango. As superfícies testadas, em um só momento, foram: bancada de aço inox, esteira de poliuretano, esteira sobreposta de “nylon”, e placas de polietileno. A metodologia de coleta das amostras foi baseada em Evancho et al (2001), Gibson et al (1999) e Moraes et al (1997), utilizando swabs estéreis friccionados em uma área de 100 cm², delimitada por molde estéril, e transferidos para tubos com 10 mL de solução tampão com neutralizante (*Swab SRK*, Copan). Foram realizadas a contagem de: microrganismos mesófilos aeróbios (Evancho et al, 2001; Swanson et al, 2001; Morton, 2001); coliformes totais e *Escherichia coli* (Evancho et al, 2001; Swanson et al, 2001; Kornacki; Johnson, 2001); *Staphylococcus sp.* e *S. aureus* (Evancho et al, 2001; BRASIL, 2003); e pesquisa de *Salmonella sp.* (Evancho et al, 2001; BRASIL, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação microbiológica das superfícies da sala de cortes de matadouro de aves estão descritos na Tabela 1.

Observou-se que a *E. coli* foi detectada na bancada de aço inox e na esteira sobreposta de nylon, *Staphylococcus sp* foi detectado em todas as amostras, *S. aureus* não foi detectado apenas na bancada de aço inox e em uma das esteiras lisas de poliuretano e *Salmonella sp* esteve ausente em todas as superfícies analisadas. Conforme Evancho et al (2001), após a higienização, as superfícies de contato com alimentos não devem apresentar mais de 100 UFC de mesófilos por área analisada. No presente estudo, avaliou-se as superfícies durante o processamento dos cortes e pôde-se observar que apenas a esteira lisa de poliuretano apresentou índices inferiores ao indicado. Isto demonstra que, mesmo que a higienização reduza a carga bacteriana, durante o processamento haverá a recontaminação das superfícies.

Tabela 1. Resultados da avaliação microbiológica das superfícies da sala de cortes de matadouro de aves.

	Amostras	Cont. mesófilos (UFC.cm ⁻²)	Colif. totais (UFC.cm ⁻²)	<i>E. coli</i> (UFC.cm ⁻²)	<i>Staphylococcus</i> spp (UFC.cm ⁻²)	<i>S. aureus</i> (UFC.cm ⁻²)	<i>Salmonella</i> sp
Linha 1	Esteira rugosa de poliuretano	5,4 x 10 ²	< 0,1	< 0,1	9,2 x 10 ²	3,5 x 10 ¹	Ausência
	Placa de polietileno	4,6 x 10 ²	1,3 x 10 ¹	< 0,1	7,0	2,8	Ausência
	Bancada de aço inox	6,8 x 10 ²	2,7 x 10 ¹	1,4 x 10 ¹	2,0	< 1,0	Ausência
Linha 2	Esteira lisa de poliuretano	2,1 x 10 ¹	< 0,1	< 0,1	6,0	4,5	Ausência
	Placa de polietileno	1,4 x 10 ²	< 0,1	< 0,1	1,3 x 10 ¹	7,8	Ausência
	Bancada de aço inox	1,7 x 10 ¹	2,6	< 0,1	< 1,0	< 1,0	Ausência
Linha 3	Esteira sobreposta de nylon	1,4 x 10 ⁴	9,2 x 10 ³	1,6 x 10 ³	8,4 x 10 ²	6,8 x 10 ²	Ausência
	Esteira lisa de poliuretano	5,4 x 10 ¹	< 0,1	< 0,1	9,0	< 1,0	Ausência
	Placa de polietileno	9,2 x 10 ²	1,8 x 10 ²	< 0,1	1,8 x 10 ²	1,1 x 10 ²	Ausência
	Bancada de aço inox	5,4 x 10 ²	1,6 x 10 ⁴	< 0,1	4,0 x 10 ¹	< 1,0	Ausência

CONCLUSÃO

Uma vez que a recontaminação das superfícies de contato durante a realização dos cortes de aves é inerente ao processo, é fundamental que as carcaças de frango que chegam à sala de desossa tenham sido obtidas por um processo rigoroso de higiene, visando diminuir ou controlar a contaminação pré-existente nestas carcaças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.

EVANCHO, G.M. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) Compendium..... 4 ed., Washington: APHA p. 25-35, 2001.

GIBSON, H.; et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. Journal App. Microbiol v. 87, p. 41-48, 1999.

KORNACKI, J.L.; et al. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *E. coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) Compendium...4 ed., Washington: APHA p. 69-82, 2001.

MORAES, M.S.V. et al. Isolament of aerobic mesofilic and thermofilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. Ciênc. Tecnol. Aliment., Sept./Dec., vol.17, n.3, p.325-329, 1997.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) Compendium... 4 ed., Washington: APHA, p. 63-67, 2001.

SWANSON, K.M.J.; et al.. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed., Washington: APHA, p. 53-62, 2001.

*Laura Beatriz Rodrigues: laurab@upf.br

III CONGRESSO LATINO-AMERICANO
IX CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS
II ENCONTRO NACIONAL DE CENTROS DE CONTROLE DE ZOONOSES
II ENCONTRO NACIONAL DO SISTEMA BRASILEIRO
DE INSPEÇÃO DOS PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

MACD 03
Realização



CBMVHA
Colégio Brasileiro de
Médicos Veterinários
Higienistas de Alimentos

Certificamos que

Rodrigues, L. B.; Soares, J.; Camargo, C. B.; Trenhago, G.; Oliveira, A. P.; Orsato, J.; Tagliari, V. Z.; Rizzo, N. N.; Fraga, S. T.; Santos, L. R.; Nascimento, V. P.

participou do III Congresso Latino-americano de Higienistas de Alimentos, IX Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, II Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses, I Encontro Nacional do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal, promovido pelo Colégio Brasileiro de Médicos Veterinários Higienistas de Alimentos, no período de 01 a 04 de maio de 2007, em Porto Seguro – Bahia, na condição de **Autor(es) do Trabalho Científico**

“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SUPERFÍCIES DE CONTATO EM UM MATADOURO DE AVES”


Dr. Gerald Vinnaes Fortes
Presidente da Sociedade de Medicina Veterinária da Bahia


Zander Barreto Miranda
Presidente IX Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos

Porto Seguro, 04 de maio de 2007


Sibelli Passini Barbosa Ferrão
Presidente Comissão Científica

4.2 TRABALHO 2

Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola

Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg
isolated from a poultry slaughterhouse

Laura Beatriz Rodrigues^{1,2}, Luciana Ruschel dos Santos¹, Natalie Nadin Rizzo¹,
Vinícius Zancanaro Tagliari¹, Amauri Picollo de Oliveira¹, Graciela Trenhago¹, Sílvio
Cezar Rodegheri¹, Ricardo Manoel Taglieti¹, Elci Lotar Dickel¹, Vladimir Pinheiro do
Nascimento³

¹: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo
(UPF), Passo Fundo, RS;

²: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS;

³: Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Correspondência:

Laura Beatriz Rodrigues

Curso de Medicina Veterinária, BR 285, Km 171, Bairro São José, CEP: 99052-900,
Passo Fundo, RS, e-mail: laurab@upf.br, Fone: (54) 3316 8485, Fax: (54) 3316 8163.

Resumo

Bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas a principal causa de infecções alimentares em humanos associadas a produtos avícolas na maioria dos países. São capazes de formar biofilmes em diferentes superfícies, dificultando sua eliminação por procedimentos de limpeza e sanificação na indústria de alimentos. Estudos demonstram uma melhor adesão microbiana com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão. Neste trabalho avaliou-se a formação de biofilme em placas de poliestireno por *S. Heidelberg* isoladas de abatedouros avícolas, cultivadas em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose e a hidrofobicidade destas cepas na fase logarítmica (4 h) e na fase estacionária (24 h) do crescimento bacteriano. No caldo TSB sem suplementação de glicose, todas as amostras foram capazes de formar biofilme, sendo duas amostras fortemente formadoras de biofilme, e a maioria fracamente formadora. Nos caldos TSB com 0,5, 1,0 e 1,5 % de glicose, todas as amostras foram fracamente formadoras. Nos caldos TSB com 2,0 a 4,0 % de glicose, várias amostras apresentaram-se não formadoras e as demais fracamente formadoras. Após a incubação a 36°C por 4 horas, o índice de hidrofobicidade foi inferior a 10 %, com todas as amostras sendo altamente hidrofílicas. Na incubação a 36°C por 24 horas os resultados foram distintos, sendo 1/16 altamente hidrofóbica, 9/16 com média hidrofobicidade e 6/16 altamente hidrofílicas. As *S. Heidelberg* foram capazes de formar biofilmes no poliestireno, enfatizando a necessidade da sua verificação em outras superfícies, além de avaliar outros hidrocarbonetos e tempos de incubação relacionados aos índices de hidrofobicidade.

Descritores: *Salmonella*, biofilme, hidrofobicidade, poliestireno

Abstract

Bacteria of the genus *Salmonella* are regarded as the major cause of food poisoning in humans, being associated with the consumption of poultry products in most countries. These bacteria can produce biofilm on different surfaces, and consequently, cleaning and sanitation procedures used in the food industry cannot remove them easily. Studies have shown that bacterial adhesion improves as hydrophobicity (both of the cell surface and of the adhesion substrate) increases. The present study assessed biofilm formation on polystyrene plates by *S. Heidelberg* strains isolated from poultry slaughterhouses, grown on TSB at different glucose concentrations, and the hydrophobicity of these strains in the logarithmic phase (4 h) and in the stationary phase (24 h) of bacterial growth. In TSB without glucose supplementation, all strains produced biofilm; two of them were strong biofilm producers, and most of them were weak biofilm producers. In TSB with 0.5, 1.0 and 1.5% of glucose, all strains were weak biofilm producers. In TSB with 2.0 to 4.0% of glucose, several strains did not produce biofilm, whereas others were weak biofilm producers. After incubation at 36°C for 4 h, the hydrophobicity index was less than 10%, and all strains were highly hydrophilic. Incubation at 36°C for 24 h yielded different results: 1 out of 16 strains was highly hydrophobic, 9 out of 16 were moderately hydrophobic and 6 out of 16 were highly hydrophilic. *S. Heidelberg* strains formed biofilm on polystyrene, which underscores the necessity to verify biofilm formation on other surfaces, in addition to investigating other hydrocarbons and incubation times in relation to hydrophobicity indices.

Key-words: *Salmonella*, biofilm, hydrophobicity, polystyrene.

Introdução

Dentre os contaminantes da carne de aves, a *Salmonella* spp. é o mais relevante enteropatógeno humano em surtos associados ao consumo deste alimento. São capazes de formar biofilme em diferentes superfícies. Na indústria alimentícia, muitas vezes encontram ambientes propícios para seu desenvolvimento, aumentando o risco da contaminação devido a sua permanência após a higienização [4,16].

Os biofilmes em condições naturais tendem a ser compostos por microrganismos em culturas mistas, e são considerados mais resistentes aos produtos utilizados comumente para limpeza e sanificação [8,10]. A formação e presença de biofilme têm sido estudadas através do uso de diferentes metodologias de quantificação, sendo muito utilizado o ensaio em placas de microtitulação [2].

As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Estudos mostram que a adesão microbiana se torna melhor com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão [7].

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a formação de biofilme em placas de poliestireno por *Salmonella* Heidelberg (SH) isoladas de abatedouro avícola e cultivadas em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose e avaliar a hidrofobicidade destas cepas em diferentes tempos de incubação: no início da fase logarítmica (4 horas) e na fase estacionária (24 horas).

Material e Métodos

A metodologia foi baseada em técnicas descritas [17, 18], adaptadas para a análise de 15 amostras de *S. Heidelberg* (SH) isoladas em abatedouro avícola de

carcaças antes do chiller ou depois do chiller e de suabes de cloaca (Tabela 1), obtidas em experimento realizado anteriormente [6]. A cepa padrão utilizada foi a *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Tabela 1. Amostras de *Salmonella* Heidelberg utilizadas no trabalho, provenientes de abatedouro avícola, isoladas de carcaças antes do chiller, depois do chiller e de suabes de cloaca, e cepa padrão *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Sigla	Microrganismo	Momento da colheita	Tipo de amostra
EB1	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-
EB2	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB3	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Depois do chiller	Carcaça de frango
EB4	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB5	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB6	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB7	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB8	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB9	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Depois do chiller	Carcaça de frango
EB10	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Depois do chiller	Carcaça de frango
EB11	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB12	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB13	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Depois do chiller	Carcaça de frango
EB14	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes do chiller	Carcaça de frango
EB15	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes da depenadeira	Suabe de cloaca
EB16	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Antes da depenadeira	Suabe de cloaca

As amostras foram inoculadas em ágar TSA (Tryptic Soy Broth without Dextrose¹, com 1,5 % de agar) sem glicose (0 %) e TSA suplementado com 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4 % de glicose, incubadas a 36°C por 24 horas e transferidas para caldo TSB¹ (Tryptic Soy Broth without Dextrose), com 0,5 % de cloreto de sódio em sua formulação, com as mesmas concentrações de glicose e incubação a 36°C por 24 horas. Em seguida, alíquotas das culturas foram adicionadas em caldo TSB¹ com a mesma concentração de glicose até atingir a escala 1 de MacFarland.

Posteriormente, 200 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculados, em triplicata, em poços de placas estéreis de microtitulação de poliestireno de 96 cavidades com fundo plano². Os controles negativos foram poços com caldos TSB¹ com cada concentração de glicose, em triplicata, não inoculados. As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas. A suspensão bacteriana foi aspirada e cada poço foi lavado 3 vezes com 250 µL de solução fisiológica a 0,9% estéril. Após, foi realizada a fixação do biofilme com 200 µL de metanol p.a³ por 15 minutos, com posterior remoção. As placas foram secas à temperatura ambiente, coradas com 200 µL de solução de cristal violeta³ de Hucker 2% durante 5 minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Após foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos 2010)⁴ a 550 nm.

O valor da densidade óptica de cada amostra (Doa) foi obtido pela média aritmética da absorbância dos três poços e este valor foi comparado com a média da absorbância dos controles negativos (Docn). Para determinar o grau de formação de biofilme foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($Doa \leq Docn$), fracamente formadora de biofilme ($Docn < Doa \leq 2.Docn$), moderadamente formadora de biofilme ($2.Docn < Doa \leq 4.Docn$) e fortemente formadora de biofilme ($4.Docn < Doa$).

Para avaliar a hidrofobicidade foram analisadas as mesmas 15 amostras de *S. Heidelberg* (SH) isoladas em abatedouro avícola, e a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028, em diferentes tempos de incubação. Inoculou-se as amostras em duplicatas do caldo BHI¹ a 36°C, mantendo-os na estufa por 4 horas e por 24 horas. Em ambos os tempos, padronizou-se 4 mL de uma suspensão bacteriana com tampão PBS (0,01M, Ph 7,2) em DO igual a 1.0 através da leitura da absorbância por espectrofotometria a 400 nm. Posteriormente, 3,6 mL de cada suspensão bacteriana foi adicionada a 0,4 mL de hidrocarboneto, neste caso o xileno³. A mistura foi agitada em vortex por 5 min e deixada em repouso por 20 min. Atingido o equilíbrio das fases oleosa/aquosa, a camada inferior foi removida e lida a absorbância a 400 nm. Considerou-se como branco o caldo BHI não inoculado, com tampão PBS e xileno, agitado, deixado em repouso e com remoção da camada inferior. O índice de hidrofobicidade (IH) foi determinado aplicando-se a fórmula: $IH = 100 \times (V_i - V_f) / V_i$, sendo V_i absorbância inicial e V_f absorbância final. Considerou-se para $IH > 70\%$ a bactéria altamente hidrofóbica, para $IH < 30\%$ altamente hidrofílica e para $30\% < IH < 70\%$ média hidrofobicidade [9].

Resultados

Na incubação em caldo TSB sem suplementação de glicose todas as amostras foram capazes de formar biofilme, sendo a maioria fracamente formadora de biofilme. Duas amostras no TSB com 0 % de glicose foram fortemente formadoras de biofilme, a EB7 e a EB10, ambas provenientes de carcaças, conforme demonstrado na Tabela 2. Nos caldos TSB com 0,5 % de glicose, TSB com 1,0 % de glicose e TSB com 1,5% de glicose, todas as amostras foram fracamente formadoras. A partir da incubação nos caldos TSB suplementados com 2,0 a 4,0% de glicose, várias amostras apresentaram-se

não formadoras e as demais fracamente formadoras. A amostra EB10 apresentou a capacidade de formar biofilme em todas as concentrações, e foi considerada fracamente formadora em todos os caldos suplementados com glicose.

Tabela 2. Resultados da formação de biofilme nas placas de microtitulação de poliestireno para *Salmonella* Heidelberg em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose, e cepa padrão *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Meios testados	Não formadoras de biofilme	Fracamente formadoras de biofilme	Moderadamente formadoras de biofilme	Fortemente formadoras de biofilme
TSB sem G	0	14	0	2
TSB + 0,5 % G	0	16	0	0
TSB + 1 % G	0	16	0	0
TSB + 1,5 % G	0	16	0	0
TSB + 2 % G	6	10	0	0
TSB + 2,5 % G	12	4	0	0
TSB + 3 % G	7	9	0	0
TSB + 3,5 % G	4	12	0	0
TSB + 4 % G	2	14	0	0

¹: TSB – Tryptic Soy Broth without Dextrose – Difco; ²: G – glicose.

Com relação à hidrofobicidade, de acordo com a Figura 1, observou-se que, após a incubação a 36°C por 4 horas, o índice de hidrofobicidade foi inferior a 10%, considerando todas as amostras (16/16) altamente hidrofílicas. Na incubação a 36°C por 24 horas as amostras apresentaram resultados distintos, sendo 1/16 altamente

hidrofóbica (EB1), 9/16 com média hidrofobicidade (EB2 a EB5 e EB12 a EB16) e 6/16 altamente hidrofílicas (EB6 a EB11).

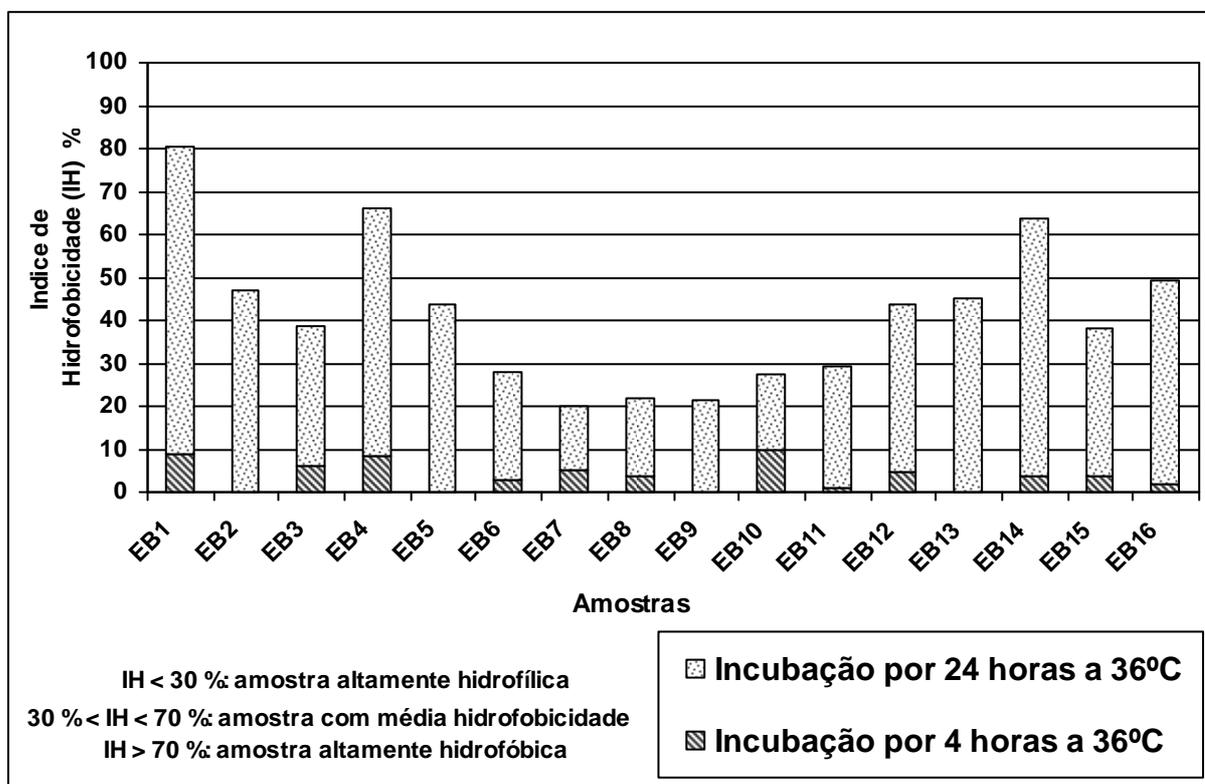


Figura 1. Resultados obtidos na avaliação da hidrofobicidade de *Salmonella* Heidelberg em caldo BHI em incubação por 4 e 24 horas, e cepa padrão *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Discussão

Um biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebida em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos, e exibe um fenótipo alterado quanto ao seu crescimento, expressão gênica e produção de proteínas [7]. Sua formação em indústrias alimentícias é de especial importância por seu potencial como uma fonte crônica de contaminação

microbiana aos alimentos, podendo transmitir doenças, além de aumentar a resistência à limpeza e sanitização [16].

A quantificação de biofilmes iniciaram com um método baseado no seu cultivo em tubos teste e subsequente coloração para detecção e reconhecimento do biofilme. Após, os poços das placas de microtitulação foram usadas como recipiente para cultivo, e os resultados foram medidos por espectrofotometria. Diferentes métodos podem ser utilizados, como os tubos teste, placas de microtitulação, microscopia, testes em placas de agar vermelho Congo, entre outros. No entanto, o método das placas de microtitulação permanece entre os ensaios mais frequentemente usados para investigação de biofilme [12,18].

Foi quantificada a formação de biofilme por 122 amostras de *Salmonella* spp em superfície de poliestireno [16], utilizando infusão cérebro coração (BHI), caldo triptona de soja (TSB), caldo de carne (MB) e caldo triptona de soja diluído 1/20 (1/20-TSB) em placas de microtitulação. Os nutrientes contidos nos meios influenciaram significativamente a quantidade de biofilme produzido. O caldo TSB diluído (1/20-TSB) foi o mais efetivo em promover a produção de biofilme pelas amostras de *Salmonella* avaliadas, seguido pelo TSB. O caldo de carne e o BHI foram os menos efetivos. Deste modo, os pesquisadores concluíram que as *Salmonella* spp testadas produziram mais biofilme em meios com nutrientes limitados.

Das *S. Heidelberg* testadas, todas foram provenientes de abatedouro avícola e formaram biofilme em meio sem adição de glicose, o que demonstra a capacidade de desenvolvimento biofilme em ambiente sem glicose, como já foi demonstrado anteriormente por estudos com *Salmonella* spp e também com a *E. coli* O157:H7 [5,16].

O uso de poucos nutrientes se torna mais preocupante quando se avalia amostras como a EB10, que foi fortemente formadora de biofilme em meio sem glicose, e é

proveniente de carcaça coletada após o chiller. Este é um dos pontos do abatedouro que apresenta grande dificuldade de higienização durante a produção da carne de frango, tornando a presença de uma *S. Heidelberg* produtora de biofilme nestes locais um risco para a saúde pública. Existe a possibilidade de contaminação cruzada nas plantas frigoríficas, além do fato de que este é um sorovar implicado em surtos de infecções de origem alimentar que já vem apresentando relatos de multi-resistência a antibióticos [11,15,20].

A adesão bacteriana pode ser dividida em estágios primários e secundários. O primeiro estágio é reversível e é determinado por variáveis físico-químicas, como as interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas, que vão determinar a adesão entre as duas superfícies, a célula bacteriana e a superfície de interesse. Na adesão secundária ocorre uma mediação molecular entre adesinas específicas e superfície, onde o microrganismo consolida sua adesão através da produção de um complexo exopolissacarídeo e/ou ligando receptores específicos presentes nas pilis com a superfície do material. No final deste estágio a adesão é irreversível [3,19].

Componentes da superfície celular promovem (hidrofobinas) ou reduzem (hidrofilinas) as propriedades que podem coexistir na superfície bacteriana, podendo ocorrer alterações na estrutura da matriz de exopolissacarídeos durante a curva de crescimento [1,14]. Pôde-se observar que, nas amostras avaliadas, houve grande alteração do índice de hidrofobicidade em relação ao tempo de incubação, podendo relacioná-lo com as diferentes fases de desenvolvimento da superfície bacteriana, como **citam os autores [1,14].**

Entretanto, outros fatores podem alterar os resultados referentes à hidrofobicidade, como o hidrocarboneto utilizado. Neste sentido, diferentes

microrganismos já foram testados frente ao xileno, octano e hexadecano, obtendo variações nos resultados quanto ao volume de hidrocarboneto e bactéria avaliada. Os hidrocarbonetos simulam a superfície de adesão, e cada um deles tem um sítio de ligação diferente, com melhores ou piores resultados para cada microrganismo. Na literatura encontrada, o uso do xileno tem sido aconselhado para *Salmonella* spp [1,13].

A presença de amostras altamente hidrofóbicas e de média hidrofobicidade quando foi utilizado 24 horas de incubação, sendo que estas mesmas amostras apresentaram a capacidade de formação de biofilme, nos fazem supor que, quanto maior o tempo de contato com a superfície, maior a chance de aderência destes microrganismos, provavelmente devido a modificações nas características da superfície bacteriana das *S. Heidelberg* avaliadas. Além disto, observa-se a importância de avaliar, nestas amostras, outros hidrocarbonetos e diferentes tempos de incubação, além de estudar a formação de biofilmes em superfícies que estão diretamente em contato com os alimentos nos abatedouros de frangos de corte.

Conclusões

Os dados obtidos por este trabalho denotam grande relevância por demonstrar que as *Salmonella Heidelberg* isoladas de amostras coletadas em abatedouros de frangos de corte possuem a capacidade de serem hidrofóbicas e de formarem biofilme na superfície testada, o que pode induzir a uma maior permanência destes microrganismos no ambiente de processamento na indústria e, conseqüentemente, a uma maior chance de transmissão aos alimentos, com riscos ao consumidor.

NOTAS INFORMATIVAS

¹ Laboratórios Difco, Sparks, USA.

² Cral artigos para laboratório Ltda, Cotia, Brasil.

³ Vetec química fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil.

⁴ Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Austria

Referências

1. **Chia T.W., Fegan N., McMeekin T.A. & Dykes G.A. 2008.** *Salmonella* Sofia differs from other poultry-associated *Salmonella* serovars with respect to cell surface hydrophobicity. *Journal of Food Protection*. 71: 2421-2428.
2. **Christensen G.D., Simpson W.A. & Bisno A.L. 1982.** Adherence of slime-producing *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection Immunology*. 37: 318-326.
3. **Costerton J.W., Cheng K.J. & Geesey G.G. 1995.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 49: 711-745.
4. **Delazari I. 1998.** Aspectos microbiológicos ligados à segurança e qualidade da carcaça de aves. In: *Anais da 8ª Semana Acadêmica Veterinária*. São Paulo: p.71-77.
5. **Dewanti R. & Wong A.C.L. 1995.** Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 26: 147-164.
6. **Dickel E.L., Santos L.R., Rodrigues L.B., Valle S.F. & Cecatti D. 2005.** Ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves com tecnologia totalmente automatizada (grande porte), semi automatizada (médio porte) e semi automatizada (pequeno porte). *Higiene Alimentar*. 19: 62-67.

7. **Donlan R.M. & Costerton J.M. 2002.** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Review*. 15: 167–193.
8. **Forsythe S.J. 2002.** Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed, 410p.
9. **Girardello R. 2007.** Estudo da Formação de Biofilme por Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas de Pacientes com Infecção Urinária. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR. 45 p.
10. **Jay J.M. 2005.** Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 711 p.
11. **Patchanee P., Zewde B.M., Tadesse D.A., Hoet A. & Gebreyes W.A. 2008.** Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans and animals. *Foodborne Pathogens and Disease*. 5: 839-851.
12. **Pitts B., Hamilton M.A., Zilver N. & Stewart P.S. 2003.** A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*. 54: 269–276.
13. **Rosenberg M., Gutnick D. & Rosenberg E. 1980.** Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 9: 29-33.
14. **Rosenberg M. & Kjelleberg S. 1986.** Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Advances in Microbial Ecology*. 9: 353-393.
15. **Smith K.E., Medus C., Meyer S.D., Boxrud D.J., Leano F., Hedberg C.W., Elfering K., Braymen C., Bender J.B. & Danila R.N. 2008.** Outbreaks of salmonellosis in Minnesota (1998 through 2006) associated with frozen,

- microwaveable, breaded, stuffed chicken products. *Journal of Food Protection*. 71: 2153-2160.
16. **Stepanovic S., Irkovic I.C., Ranin L. & Svabic-Vlahovic M. 2004.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 428–432.
 17. **Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. & Vlahovic M.S.A. 2000.** Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40: 175-179.
 18. **Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Bonaventura G., Djukic S., Irkovic I.C. & Ruzicka F. 2007.** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS - Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 71: 687–690.
 19. **Vesterlund S., Paltta J., Karp M. & Ouwehand A.C. 2005.** Measurement of bacterial adhesion in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*. 60: 225–233.
 20. **Vincent V., Scott H.M., Harvey R.B., Alali W.Q. & Hume M.E. 2007.** Novel surveillance of *Salmonella enterica* serotype Heidelberg epidemics in a closed community. *Foodborne Pathogens and Disease*. 4: 375-385.

**INFORMAÇÃO - PARECER FINAL****ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE**

ISSN 1679-9216 (On line)

Fax: 0**51 3308 7305 Fone: 0**51 3308 6964

e-mail: laerte.ferreiro@ufrgs.br**Home Page: www.ufrgs.br/actavet/**

Porto Alegre, 3 de abril de 2009.

Senhor (a) autor (a) para correspondência: Laura B. Rodrigues, Luciana R. dos Santos, Natalie N. Rizzo, Vinícius Z. Tagliari, Amauri P. Oliveira, Graciela Trenhago, Sílvio C. Rodegheri, Ricardo M. Taglieti, Elci L. Dickel & Vladimir P. Nascimento

Trabalho intitulado: Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola

X Obteve parecer **favorável** para publicação no Volume: 37 (3): 111-116, 2009.

- Recebeu parecer desfavorável do Corpo Consultivo Científico.
- Não se enquadra, segundo parecer do Conselho Editorial, dentro dos objetivos da Revista.
- Poderá ser recebido para análise uma vez redigido segundo as Instruções aos Autores (www.ufrgs.br/actavet/)

Atenciosamente,

Laerte Ferreiro - Editor**P/ Conselho Editorial –ASV**

4.3 TRABALHO 3



Evolução e diversidade

7 a 9 de outubro de 2008

COMPARAÇÃO DO USO DE SWAB E DE ESPONJA PARA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DA SALA DE CORTES DE UM MATADOURO DE AVES.

AUTOR PRINCIPAL: Amauri Picollo de Oliveira

EMAIL: amauri_po@upf.br

DEMAIS AUTORES: Natalie Nadin Rizzo, Vinicius Zancanaro Tagliari, Daiane Ferreira, Graciela Trenhago, Keli Hepp, Jucenara Soares, Franciane Goetz, Robson Dupont Rohr, Florindo L. Castoldi, Luciana Ruschel dos Santos

ORIENTADOR: Laura Beatriz Rodrigues

ÁREA: Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO NO CNPQ: 5.07.01 03-7 – Microbiologia de Alimentos

Código e nome disponível em <http://www.cnpq.br> ou <http://www.upf.br/pesquisa/>

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

A manutenção do Brasil como primeiro exportador mundial de carne de frango exige uma grande necessidade de sanidade dos plantéis avícolas e, também, das condições higiênico-operacionais dentro dos abatedouros. A presença de microrganismos no ambiente de processamento dos alimentos pode levar à sua contaminação, reduzindo a qualidade. As superfícies em contato com os alimentos como, as bancadas de inox, as esteiras lisas, as esteiras sobrepostas e as placas de polietileno constituem pontos importantes que devem ser avaliados de forma a não representarem risco de contaminação, evitando contaminação direta ou cruzada e a adulteração do produto, preservando sua qualidade por meio da higiene antes, durante e depois das operações industriais. Foram avaliadas as condições higiênico-operacionais de superfícies de contato com alimentos em uma sala de cortes de abatedouro avícola, com duas metodologias de esfregação: swabs e esponjas, para analisar a efetividade da higienização operacional.

METODOLOGIA:

O trabalho foi realizado em matadouro de aves, na linha dos cortes de peito de frango. As amostras foram coletadas na higienização operacional, antes da lavagem e após a lavagem com água quente, em 6 ou 7 repetições para cada tipo de superfície (mesas de aço inox, esteiras de poliuretano, placas de polietileno, esteira sobreposta de nylon). As coletas e os ensaios estavam de acordo com Downes; Ito (2001). As amostras foram coletadas utilizando swabs, os quais foram friccionados 20 vezes nos sentidos das diagonais, em uma área de coleta de 100 cm² e transferidos para 10 mL de solução tampão neutralizante. Como esponja foram utilizados lenços dobrados e umedecidos com 50 mL de AP 0,1 % com neutralizantes. Com molde de 100 cm², foram friccionadas contra a superfície com 10 movimentos da esquerda para a direita e 10 movimentos de baixo para cima e retornaram à bolsa de origem com mais 50 mL de AP 0,1%. Foi realizada a contagem total de bactérias mesófilas em todas as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:



Evolução e diversidade

7 a 9 de outubro de 2008

Nas bancadas de aço inox, antes da higiene operacional a média em log UFC/cm² nas esponjas e nos swabs foi, respectivamente, de 1,38 e 1,40. Após a higiene operacional, tanto nas esponjas quanto nos swabs as médias diminuíram, obtendo-se, respectivamente, 0,76 e 0,77. Nas esteiras lisas de poliuretano, antes da higiene operacional, a média em log UFC/cm² nas esponjas e nos swabs foi, respectivamente, de 1,87 e 1,96. Após o uso da água quente, obteve-se, respectivamente, 1,64 e 1,74. Nas placas de polietileno antes da higiene operacional a média em log UFC/cm² nas esponjas e nos swabs foi, respectivamente, de 3,32 e 2,19. Após a higiene operacional, nas esponjas a média diminuiu para 2,54. No entanto, nos swabs ocorreu um aumento na média para 2,87. Nas esteiras sobrepostas de nylon antes da higiene operacional a média em log UFC/cm² nas esponjas e nos swabs foi, respectivamente, de 2,81 e 2,76. Após a higiene operacional, nas esponjas e nos swabs as médias aumentaram, respectivamente, para 3,00 e 3,38, provavelmente devido aos espaços que existem nesta superfície entrelaçada, que acumulam resíduos. Foi realizada a análise estatística dos resultados utilizando ANOVA, e não houve interação entre tipo de superfície, momento da coleta e método utilizado, com $p = 0,8206$. De acordo com Silva et al. (2007), a técnica do esfregão de superfície aplica-se aos alimentos cuja contaminação é predominantemente superficial, como carcaças, de bovinos, suínos, aves e peixes. Aplica-se também à análise de superfícies de equipamentos, mesas, utensílios e embalagens. A contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis tem sido utilizada como um indicador da qualidade higiênica dos alimentos e de superfícies, fornecendo também idéia sobre tempo útil de conservação. Deste modo, como não houve diferença estatística entre swab e esponja, ambos podem ser utilizados para o controle higiênico-sanitários de superfícies.

CONCLUSÃO:

As duas metodologias utilizadas para coleta, esponja e swab, podem ser utilizadas para a verificação da higienização em superfícies como as bancadas de aço inox, esteiras de poliuretano, esteira sobreposta de nylon e placas de polietileno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed., Washington: American Public Health Association, 676 p, 2001.

SILVA, Neusely da. [et. al.] Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

DIVISÃO DE PESQUISA

CERTIFICADO

Certificamos que **AMAURI PÍCCOLLO DE OLIVEIRA**, registro nº 026, apresentou o trabalho de sua autoria "COMPARAÇÃO DO USO DE SWAB E DE ESPONJA PARA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DA SALA DE CORTES DE UM MATADOURO DE AVES" sob a orientação de **LAURA BEATRIZ RODRIGUES**, na XVIII MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, promovida pela Divisão de Pesquisa da Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade de Passo Fundo, no período de 07 a 09 de outubro de 2008, tendo como co-autores **Natalie Nadin Rizzo**, **Vinicius Zancanaro Tagliari**, **Daiane Ferreira**, **Graciela Trenhago**, **Keli Hepp**, **Jucenara Soares**, **Franciane Goetz**, **Robson Dupont Rohr**, **Florindo Luiz Castoldi**, **Luciana Ruschel dos Santos**.

O Projeto foi aprovado pela Câmara de Extensão em 10 de junho de 2008, ata nº 222.

Passo Fundo, 29 de setembro de 2008.


Prof. Dr. Hugo Tourinho Filho
Vice-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação


Prof. Dr. Carlos Amaral Hölbig
Coordenador da Divisão de Pesquisa


Prof. Ms. Cléa Bernadete Silveira Netto Nunes
Vice-Reitora de Extensão e Assuntos Comunitários

4.4 TRABALHO 4

Investigation of *Salmonella sp* and *Listeria sp* from stainless steel, polyurethane and polyethylene surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse

Laura Beatriz Rodrigues^{I,II*}; Luciana Ruschel dos Santos^I; Natalie Nadin Rizzo^I; Vinícius Zancanaro Tagliari^I; Keli Hepp^I; Graciela Trenhago^I; Amauri Picollo de Oliveira^I; Franciane Goetz^I; Daiane Ferreira^I; Vladimir Pinheiro do Nascimento^{II}.

^IFaculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo;

^{II}Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the presence of *Salmonella sp* and *Listeria sp* in different surfaces that come in contact with food and the efficacy of the disinfection process. First, the level of detection of the methods to isolate *Salmonella sp* and *Listeria monocytogenes* was determined using Laborclin[®] sponges to which 0.5 g of chicken fat were added and which were artificially contaminated with *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. The level of relative detection for isolation of *Salmonella* Typhimurium was 1 cfu/150 ml of 1% peptone water and of *Listeria monocytogenes*, 2 cfu/150 ml of 1% peptone water. In the slaughterhouse, samples were collected at the end of the processing of cuts, before and after the surfaces were washed with hot water and after disinfection. The disinfectants tested were 0.5% peracetic acid, 2% quaternary ammonium and 1% biguanide. Samples were collected at random from stainless steel tables, polyurethane conveyors and

polyethylene boards used for cutting chicken legs at the same time. Material was collected four times for each of the three surfaces, and 108 trials were conducted for each microorganism. *Salmonella sp* was not isolated in any of the surfaces analyzed. Before washing, *Listeria welshimeri* was found in the polyurethane conveyor and *Listeria monocytogenes* in the stainless steel table, both surfaces with food residues. After washing with hot water, *Listeria monocytogenes* was isolated in the polyurethane conveyor of line 2, but was no longer found after disinfection with 2% quaternary ammonium.

Keywords: *Salmonella*, *Listeria*, surfaces, disinfectants

Pesquisa de *Salmonella sp* e *Listeria sp* em aço inox, poliuretano e polietileno da sala de cortes de um matadouro avícola

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar *Salmonella sp* e *Listeria sp* em diferentes superfícies de contato com alimentos e a eficácia do processo de sanitização. Inicialmente determinou-se o nível de detecção relativa das metodologias de isolamento de *Salmonella sp* e de *Listeria monocytogenes* tendo como matrizes esponjas Laborclin[®] acrescidas de 0,5g de gordura de frango e contaminadas artificialmente com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. O nível de detecção relativa para *Salmonella* Typhimurium foi de 1 UFC/150ml de AP1% e para *Listeria monocytogenes* foi de 2 UFC/150 ml de AP1%. No abatedouro, as amostras foram coletadas no final do processamento dos cortes, antes e após a lavagem das superfícies com água quente e após a sanitização. Os desinfetantes testados foram ácido peracético a 0,5%, amônia quaternária a 2% e biguanida a 1%. As avaliações foram realizadas em linhas de cortes, ao mesmo tempo, em três superfícies: mesas de aço inox, esteiras de

poliuretano e placas de polietileno. As coletas foram feitas em quatro repetições para cada uma das três superfícies, totalizando 108 ensaios para cada microrganismo. *Salmonella sp.* não foi isolada em nenhuma das superfícies testadas. Antes da lavagem, na linha dois, isolou-se *Listeria welshimeri* da esteira de poliuretano e *Listeria monocytogenes* da mesa de aço inoxidável, ambas de superfícies contendo resíduos de alimentos. Após a lavagem com água quente isolou-se *Listeria monocytogenes* da esteira de poliuretano, também na linha 2, sendo que este agente não foi novamente isolado após o tratamento com amônia quaternária a 2%.

Palavras-chave: *Salmonella*, *Listeria*, superfícies, sanitizantes

INTRODUCTION

Cleaning in poultry slaughterhouses consists basically of the use of hot water, detergents and disinfectants (6). Although detergents decrease the bacterial load found on surfaces, the main objective of their use is to remove organic and mineral residues. Disinfection, which is the last stage of the cleaning process, aims at reducing microorganisms and eliminating pathogens so that levels are safe for good quality products (16).

Among poultry meat contaminants, pathogenic microorganisms such as *Salmonella sp* and *Listeria monocytogenes* are of utmost importance because they cause foodborne diseases and consequently result in economic losses in the domestic market and in exports.

Listeria monocytogenes is widely distributed in nature and often found in meat products. This pathogen causes listeriosis, an atypical food infection with high mortality rates, a long incubation time, and predilection for immunodeficient individuals (21). Although fresh meats usually have a low level of *L. monocytogenes*, the risk of

contamination is higher as the level of food processing increases. A previous study analyzed 48 chicken carcasses from different plants and supermarkets in Florianópolis, Brazil, and *Listeria sp* was found in 21 (43.7%) of the samples (19).

Salmonella is the most important microorganism in outbreaks associated with poultry meat (7, 17). In several countries, products made with eggs and chicken meat are the main causes of human enteritis, and outbreaks assigned to *Salmonella* are often recorded (15). It is one of the human enteropathogens most often associated with intestinal microbiota in poultry, and originates from different sources in the poultry environment (3). Carcasses contaminated with *Salmonella sp* usually have a small number of bacteria (<100 cfu/carcass), unless there is inadequate conservation at high temperatures and, consequently, intense multiplication (10, 15).

This study investigated the presence of *Listeria* and *Salmonella* on the contact surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse at the end of the processing of cuts, before and after the surfaces were washed with hot water and after disinfection with peracetic acid, quaternary ammonium or biguanide and the effects of these treatments on the reduction of these microorganisms.

MATERIAL AND METHODS

Determination of relative detection limit

The relative detection limit, or detection threshold, of the methods used to isolate *Salmonella sp* and *Listeria monocytogenes* was based on ISO 16140:2003 (11). Laborclin[®] sponges were used as matrices with 50 ml of 1% peptone water (PW) with neutralizing agents to which 0.5 g of chicken fat was added, obtained from chickens that were proven negative for *Salmonella spp.* and *Listeria spp.* For the artificial contamination of the samples, ATCC strains were incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 to 24 h

and then diluted. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 was used at concentrations of 1 cfu/150 ml of 1% peptone water (PW) (1 ml of the 10^{-9} dilution), 5 cfu/150 ml of 1% PW (0.5 ml of 10^{-8} dilution) and 10 cfu/150 ml of 1% PW (1 ml of 10^{-8} dilution), and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 at concentrations of 2 cfu/150 ml of 1% PW (1 ml of 10^{-9} dilution), 6 cfu/150 ml of 1% PW (0.5 ml of 10^{-8} dilution) and 12 cfu/150 ml of 1% PW (1 ml of 10^{-8} dilution). Ten matrix repetitions were made for each concentration and negative controls (no microorganism inoculation). The analysis of each sample was made in duplicate.

The methods of pre-enrichment followed the studies by Brasil (2) and Evancho et al. (8) by adding 100 ml of 1% buffered PW to the bag with the sponge (Laborclin[®] sponges, 50 ml of 1% PW and neutralizing agents) for each sample, which were blended in a stomacher for 1 minute. After blending, the microorganisms were inoculated to achieve the concentrations described above. For the investigation of *Listeria monocytogenes*, they were incubated at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18-24 hours, and for *Salmonella sp.*, at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 16-20 hours. The methods used to complete the isolation of microorganisms were the same described in items 2.4.1.1 and 2.4.1.2. The detection threshold was defined as the minimum concentration at a frequency of at least 50%.

Sampling

This study was conducted in the cutting room of a poultry slaughterhouse with capacity for 20,000 animals per hour in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Samples were collected at the end of cutting, during preoperational cleaning: before the surfaces were washed, without the removal of residues; after washing with hot water at 45 to 50°C and 22.5 bar pressure; and after washing with 2% sodium hydroxide detergent (Power Foam[®], Johnson Diversey) was applied using a foam generator for 10 minutes. Water at

45 to 50°C and 22.5 bar pressure were used for rinsing and disinfection. Three disinfectants were tested: 0.5% peracetic acid (Divosan Forte[®], Johnson Diversey) was applied to line 1, 2% quaternary ammonium (Divosan Divoquat Forte[®], Johnson Diversey) to line 2, and 1% biguanide (Divosan Divosept 350[®], Johnson Diversey) to line 3, all of them for 15 minutes, followed by rinsing, as described above. Evaluations were made in three processing lines for cutting chicken legs at the same time and on fully randomized sites of three surfaces: stainless steel tables, polyurethane conveyors, and polyethylene cutting boards. Samples were collected four times for each of the three surfaces. Therefore, 36 analyses were performed for each surface to investigate the presence of *Salmonella sp.*, and 36 for *Listeria sp.*, in a total of 108 tests for each microorganism.

Sample collection

Test samples were collected from the surfaces using conventional microbiology methods according to Evancho et al. (8). Sponges (Laborclin[®] sponge with 50 ml of 1% peptone water and neutralizing agent) were used to scrub each surface randomly in an area of 100 cm² delineated by a sterile metal template. All samples were sent to the laboratory under refrigeration in isothermal containers.

Investigation of *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* and other species of *Listeria*

Pre-enrichment

The pre-enrichment method was described by Brasil (2) and Evancho et al. (8): 100 ml of 1% peptone water was added to the bag with the sponge (Laborclin[®] sponge with 50 ml of 1% peptone water and neutralizing agent). After 1 minute in a stomacher blender, an aliquot of 50 ml was transferred to a sterilized container and incubated at 30 ± 1°C

for 18-24 hour to isolate *Listeria sp.* The bag with the remaining 100 ml was incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 16-20 hours for the isolation of *Salmonella sp.*

Isolation of Salmonella sp

The method used was described by Andrews et al. (1), Brasil (2), Evancho et al. (8) and McNamara (14). Selective enrichment was conducted in Rappaport-Vassiliadis (Laborclin[®]) medium and selenite cystine (Laborclin[®]) broth for 24 to 30 hours at $41 \pm 0.5^\circ\text{C}$ in water bath. Isolation was conducted in chromogenic agar for *Salmonella* (Laborclin[®]) and brilliant-green phenol-red lactose sucrose agar (Laborclin[®]) incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18-24 hours. Colonies compatible with *Salmonella* were confirmed using biochemical and serological tests. Results were described as presence or absence.

Isolation of Listeria monocytogenes and other Listeria species

The method used was described by Evancho et al. (8), Hitchins (9) and Ryser and Donnelly (20). Selective enrichment was performed in Fraser (Laborclin[®]) broth for 18-24 hours at $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Isolation was conducted in agar Listeria according to Ottaviani and Agosti - ALOA (Laborclin[®]) agar and Modified Oxford - MOX (Laborclin[®]) agar incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24-48 hours. The colonies compatible with *Listeria sp* were confirmed for *L. monocytogenes* and other species using biochemical tests. Results were described as presence or absence.

RESULTS

Relative detection limit

The detection limit for the method used to isolate *Salmonella* Typhimurium was 1 cfu/150 ml of 1% PW because the microorganism was found in 9 of the 10 samples

artificially contaminated. At the other concentrations, *Salmonella* Typhimurium was isolated in all samples. The detection limit of the method to investigate *Listeria monocytogenes* was 2 cfu/150 ml of 1% PW; bacteria were found in 8 of the 10 artificially contaminated samples. At concentrations of 6 cfu/150 ml of 1% PW, *Listeria monocytogenes* was isolated in 9 of the 10 samples, and at 12 cfu/150 ml of 1% PW, in all samples.

Investigation of *Salmonella* sp.

Salmonella sp was not isolated in any of the surface samples analyzed: stainless steel, polyurethane or polyethylene.

Investigation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species

Listeria sp was not isolated from any of the surfaces in lines 1 and 3 (stainless steel, polyurethane and polyethylene). In line 2, *Listeria welshimeri* was isolated from the polyurethane conveyor, and *Listeria monocytogenes*, from the stainless steel table, both when the surfaces had food residues, before washing. After washing with hot water, *Listeria monocytogenes* was isolated from the polyurethane conveyor, also in line 2. *Listeria* sp was not isolated after disinfection with 2% quaternary ammonium. Results are shown in Table 1.

DISCUSSION

In the method used in this study, the level of detection for *Listeria monocytogenes* was 2 cfu/150 ml of 1% PW, and bacteria were found in 80% of the samples. For *Salmonella* Typhimurium, the level was 1 cfu/150 ml of 1% PW because bacteria were found in 90% of the artificially contaminated samples.

Tomazelli et al. (22) studied the detection of *Salmonella* in food, water and environmental samples using the comparison of the BAX system and the official Brazilian method, and established that the relative detection level of the method was 1 to 2 cfu/25 g of sample.

Loncarevic et al. (13) validated a method of detection of *Listeria monocytogenes* using a level of contamination of 18 cfu/25 g and found a sensitivity of 94.4 to 96.4% in ALOA, LCA, OCLA and LMBA using conventional microbiological methods after enrichment with Half-Fraser broth, and sensitivity of 97.7 to 100% when two enrichment methods were used, Half-Fraser followed by Fraser.

In our study, *Salmonella sp* was not found in the different lines, surfaces (stainless steel table, polyurethane conveyor and polyethylene cutting boards) and collection time points (before surface washing, after washing with hot water, and after disinfection). As the detection limit of the method was 1 cfu, *Salmonella* was likely to be absent or below 1 cfu in the collection areas, which were 100 cm². On the surfaces studied, *Salmonella* was not found, which may be assigned to the fact that the batch of slaughtered broilers was free of this microorganism or that good production practices and the hazard analysis and critical control point in this industry were adequately applied.

To investigate contamination of surfaces on a poultry slaughtering line of infected poultry and subsequent cross-contamination of non-infected poultry, Olsen et al. (18) investigated the presence of *Salmonella* at 17 defined points over two 1-week periods. Equipment at all but one control point on the slaughter line tested positive at least once

during the study. The live receiving area was the most contaminated. The number of positive samples from control points in the sections used for killing, evisceration and giblet processing, cooling and the final processing and packaging area indicated that contamination decreases towards the end of the processing line, it may indicate that contamination decreases towards the end of the processing line and cleaning is therefore more effective at this stage. However, it may also simply reflect that there are less *Salmonella* left to contaminate the equipment, the longer the chicken has been on the processing line. Therefore, the results obtained in our experiment, with absence of *Salmonella* on the surfaces in contact with foods, may be related to the findings of Olsen et al. (18), as the samples were collected from the cutting room, one of the environments with lowest contamination in the slaughterhouse.

Listeria sp was not recovered from the stainless steel tables, the polyurethane conveyors and the polyethylene cutting boards of lines 1 and 3 at any collection time point. As the detection limit of the method was 2 cfu, *Listeria* was absent or below 2 cfu in the collection areas, which were 100 cm².

In line 2, *Listeria welshimeri* was found in the polyurethane conveyor, and *Listeria monocytogenes*, in the stainless steel table when the surfaces contained food residues and before washing. *Listeria sp* was not found in the polyethylene cutting boards. After operational cleaning, which consisted of removal of residues from the surfaces using hot water with pressure, *Listeria sp* was not recovered from the stainless steel tables or polyethylene cutting boards, but *Listeria monocytogenes* was found in the polyurethane conveyor, which suggested that hot water alone was not enough to eliminate the microorganism from this surface. The isolation of different *Listeria* species on the same

surface (polyurethane conveyor) may be assigned to the fact that four different sites were examined in sample collection, and that there might have been different species contaminating the surfaces on random sites. With regard to the total number of samples, 2.7% (3 samples) showed contamination by *Listeria sp.*, but unlike other surfaces, *L. monocytogenes* was isolated from the polyurethane conveyor after hot water washing.

After washing with hot water, a 2% sodium hydroxide detergent was applied and water was used for rinsing. Thereafter, 0.5% peracetic acid was applied to line 1, 2% quaternary ammonium to line 2, and 1% biguanide to line 3. After this stage of disinfection, *Listeria* was no longer isolated, which indicates that the use of a detergent and posterior use of quaternary ammonium were efficacious in removing the microorganisms from this surface. This is also important to prevent biofilm production by microorganisms, as in another experiment, all of the *Listeria* strains formed biofilm on plastic surfaces (data not shown).

According to Kasková et al. (12) cleaning and disinfection play a major role in an effective program to control diseases in poultry production and processing facilities. Therefore, they conducted a study to investigate the efficacy of disinfection in a poultry processing plant. Peracetic acid at 0.01% and 0.1% quaternary ammonium applied for 20 minutes were efficient against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*.

In a study conducted for comparing the presence of *Listeria* in automated (plant A) and manually operated (plant M) slaughterhouses, the food contact surfaces and the non-food contact surfaces were assessed, and so were samples of water and broilers obtained

from different slaughtering steps. *Listeria monocytogenes* was detected in 85 (20.1%) samples from plant A and 70 (16.4%) from plant M. Plant A samples were also positive for *Listeria innocua* (48.5%, 205 samples) and for *Listeria welshimeri* (3.3%, 14 samples). Plant M samples revealed that 58.4% (250) harbored *L. innocua* and 0.9% (4) *L. welshimeri*. The prevalence of *L. monocytogenes* relative to food contact surfaces amounted to 19.6% in plant A and 17.3% in plant M. (5).

On assessing environmental factors by comparing them with the absence or presence of contamination by *L. monocytogenes* in poultry and pork processing plants, Chasseignaux et al. (4) evaluated characteristics of the analyzed surfaces and workrooms and found that *Listeria* was isolated from most plants, from surfaces and environments with a temperature less than 10°C and moisture greater than 70%. These environmental characteristics are similar to those observed in the cutting rooms of slaughterhouses, and are consistent with the conclusions obtained by Chiarini et al. (5), who noted that *L. monocytogenes* was more frequently isolated in products collected after immersion chilling, which indicates that this pathogen would be more frequently disseminated in cutting rooms, where the temperature is approximately 10°C, compared with the reception-evisceration area, where the temperature is above 25°C.

The psychotrophic properties of *L. monocytogenes* concur with the findings of these studies, as such properties could select *Listeria* and indicate some difficulty in the growth of competitive microflora. And, at high temperatures, the microflora can compete with *Listeria* and prevent its establishment. The cutting room is cleaner than the evisceration area, with lower temperature, and less competitive microorganisms, being more susceptible to the growth of *Listeria* than that of *Salmonella* (4, 5, 18)

Poultry slaughterhouses should detect which microorganisms predominate at different sites of the industry, so that they can fight them in a specific manner, as *Salmonella* may not be the most relevant pathogen in a cutting room, whereas *Listeria* may, due to its growth characteristics and to the environmental conditions of the cutting room. The importance of effective cleaning should be underscored, since in this experiment *Listeria* was recovered after the use of hot water, but not after the use of sanitizing agents.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Laborclin for supplying the culture media and sponges. We also thank the staff at the Laboratory of Microbiology of the Food Research Center of Universidade de Passo Fundo, Brazil. Finally, we thank Sabrina Tolotti Fraga and Lair Lizot Chaves for their invaluable assistance.

References

1. Andrews, W.H.; Flowers, R.S.; Silliker, J.; Bailey, J.S. (2001). *Salmonella*, p. 357–380. In: Downes, F.P., Ito, K.(eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. Brasil. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária – Secretária de Defesa Agropecuária.– Oficializar os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e águas. Diário Oficial, [da República Federativa do Brasil], Brasília, p.14, 18 de setembro de 2003. Seção 1.
3. Cardoso, A.L.S.P.; Tessari, E.N.C.; Castro, A.G.M.; Kanashiro, A.M.I. (2000). Pesquisa de *Salmonella spp.*, coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. Online *Arq. Inst. Biol., São Paulo* 67 (1), Available at: http://www.biologico.br/arquivos/v.67_1/pesquisa_salmonella. Accessed 12 Dec 2008. ISSN 0020-3653.
4. Chasseignaux, E.; Géralt, P.; Toquin, M.; Salvat, G.; Colin, P.; Ermel, G. (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 271-275.
5. Chiarini, E.; Tyler, K.; Farber, J.M.; Pagotto, F.; Destro, M.T. (2009). *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. *Poult Sci.* 88, 791-797.
6. Contreras, C.C.; Bromberg, R.; Cipolli, K.M.V.A.; Bittencourt, M.L. (2002). *Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados*. Varela, São Paulo.

7. Delazari, I. (1998). Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves. In: Semana Acadêmica Veterinária, 8., 1998, São Paulo. Anais. São Paulo. pp.71-77.
8. Evancho, G.M.; Sveum, W.H.; Moberg, L.J.; Frank, J.F. (2001). Microbiological monitoring of the food processing environment, p. 25-35. In Downes, F.P., Ito, K. (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
9. Hitchins, A.D. (2003). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In Bacteriological Analytical Manual. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>. . Accessed 19 Sep 2008.
10. Ingram, M.; Simonsen, B. (1990). Poultry and poultry meat products, p. 410–458. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microbial ecology of foods: food commodities*. Academic Press, New York.
11. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods.
12. Kasková, A.; Ondrasovicová, O.; Vargová, M.; Ondrasovic, M.; Venglovský, J. (2007). Application of peracetic acid and quaternary ammonium disinfectants as a part of sanitary treatment in a poultry house and poultry processing plant. *Zoonoses Public Health*. 54, 125–130.
13. Loncarevic, S.; Økland, M.; Sehic, E.; Norli, H.S.; Johansson, T. (2008). Validation of NMKL method No. 136 — *Listeria monocytogenes*, detection and enumeration in foods and feed. *Int. J. Food Microbiol.* 124,154–163.

14. McNamara, A.M.; Schultz, A.; Dick, N.; Ritter, V.; Kircher, S.; Warns, P.; Sturm, K. (2005). Evaluation of BBL™ CHROMagar™ *Salmonella*: AOAC Performance Tested Method. Annual AOAC Meeting, LR917.
15. Mead, G.C. (1989). Hygienic problems and control of process contamination, p. 360–368. In: Mead, G. C. *Processing of poultry*. Elsevier, New York.
16. Moraes, M.S.V.; Andrade, N.J.; Chaves, J.B.P.; Passos, F.J.V.; Gomide, L.A.M. (1997). Isolament of aerobic mesofilic and thermofilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 17, 325–329.
17. Nde, C.W.; McEvoy, J.M.; Sherwood, J.S.; Logue, C.M. (2007). Cross Contamination of Turkey Carcasses by *Salmonella* Species During Defeathering. *Poult. Sci.* 86, 162–167.
18. Olsen, J.E.; Brown, D.J.; Madsen, M.; Bisgaard, M. (2003). Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *J. Appl. Microbiol.* 94, 826–835.
19. Pelisser, M.R.; Mendes, S.D.C.; Sutherland, A.D.; Batista, C.R.V. (2001). Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified conventional culture method. *Braz. J. Microbiol.* 32,113–116.
20. Ryser, E.T.; Donnelly, C.W. (2001). *Listeria*, p. 343–356. In: Downes, F. P., Ito, K. (eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
21. Silva, W.P.; Lima, A.S.; Gandra, E.A.; Araújo, M.R.; Macedo, M.R.P.; Duval, E. H. (2004). *Listeria spp.* no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciênc. Rural.* 34, 911–916.

22. Tomazelli, I.B.; Freitas, J.B.; Fabbi, L.M.; Filipini, T.A.; Silva, C.M.S.; Bedin, J. M.; Duarte, D.A.M.; Santos, A.; Baccharin, A.; Higa, L.R.G.; Yano, D.M.Y.; Killner, M.; Frezza, A.L.C.; Abecia, E.C.G.A.; Tronco, V.M.; Tomazelli Jr, O.; Barioni Jr, W. (2008). Comparison of the BAX System PCR Method to Brazil's Official Method for the Detection of *Salmonella* in Food, Water, and Environmental Samples. *J. Food Prot.* 71, 2442–2447.

Tables

Table 1 – Results of investigation of *Salmonella sp* and *Listeria sp* on different surfaces (stainless steel, polyurethane and polyethylene) in the cutting room of a poultry slaughterhouse.

		Before washing		After hot water washing		After disinfection	
		<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
Line 1 ^a	Polyurethane conveyor	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Polyethylene boards	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Stainless steel table	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Line 2 ^b	Polyurethane conveyor	Absence	<u>Presence</u> ^d	Absence	<u>Presence</u> ^e	Absence	Absence
	Polyethylene boards	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Stainless steel table	Absence	<u>Presence</u> ^e	Absence	Absence	Absence	Absence
Line 3 ^c	Polyurethane conveyor	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Polyethylene boards	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
	Stainless steel table	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence

a: 0.5% peracetic acid was used in this line.

b: 2.0% quaternary ammonium was used in this line.

c: 1.0% biguanide was used in this line.

d: Isolation of *Listeria welshimeri*.

e: Isolation of *Listeria monocytogenes*.

#BJM-106 : Investigation of Salmonella sp and Listeria sp from stain...

•	SUMMARY
•	REVIEW
•	EDITING

Submission

Authors	Laura Beatriz Rodrigues, Luciana Ruschel Santos, Natalie Nadin Rizzo, Vinícius Zancanaro Tagliari, Keli Hepp, Graciela Trenhago, Amauri Picollo Oliveira, Franciane Goetz, Daiane Ferreira, Vladimir Pinheiro Nascimento
Title	Investigation of Salmonella sp and Listeria sp from stainless steel, polyurethane and polyethylene surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse
Original file	BJM-106-11571-54440-1-SM.DOC 2009-04-20
Supp. files	None ADD A SUPPLEMENTARY FILE
Submitter	Laura Beatriz Rodrigues 
Date submitted	April 20, 2009 - 08:09 AM
Section	Veterinary Microbiology
Editor	None assigned
Author comments	April 19, 2009

Dear Editor,

We are sending you the manuscript entitled Investigation of Salmonella sp and Listeria sp from stainless steel, polyurethane and polyethylene surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse, which we would like you to consider for publication in the Brazilian Journal of Microbiology.

The manuscript has not been published and is not under consideration for publication in any other journal.

We look forward to hearing from you regarding the status of our manuscript. In the meantime, please feel free to contact us if you need any additional information.

Sincerely,

Laura B. Rodrigues
E-mail: laurab@upf.br

Status

Status	Awaiting assignment
Initiated	2009-04-20
Last modified	2009-04-20

4.5 TRABALHO 5

ATP-BIOLUMINESCÊNCIA E MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL (PLACAS RODAC E ESPONJA) NA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS EM SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS EM SALA DE CORTES DE MATADOURO DE AVES

Laura Beatriz Rodrigues^{1,2}, Luciana Ruschel dos Santos¹, Vinícius Zancanaro Tagliari¹,
Natalie Nadin Rizzo¹, Graciela Trenhago¹, Daiane Ferreira¹, Amauri Picollo de
Oliveira¹, Franciane Goetz¹, Carlos Costa¹, Florindo Luiz Castoldi¹, Vladimir Pinheiro
do Nascimento²

¹: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo;

²: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

Foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias das superfícies de uma sala de cortes de abatedouro avícola, utilizando microbiologia convencional (placas Rodac e esponja para quantificação de mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) e ATP-bioluminescência para analisar a ação da água quente e de três princípios ativos no processo de higienização. As amostras foram coletadas no final do processamento dos cortes, antes e após a lavagem das superfícies com água quente e após a sanitização com ácido peracético a 0,5%, amônia quaternária a 2% e biguanida a 1%. As avaliações foram realizadas em três linhas de cortes de coxa de frango, ao mesmo tempo e de forma completamente casualizada, em superfícies de aço inoxidável, esteiras de poliuretano ou placas de polietileno. As coletas foram feitas em quatro repetições para cada uma das três superfícies, totalizando 108 ensaios para cada microrganismo. O método ATP-bioluminescência detectou matéria orgânica em todos os pontos coletados demonstrando ser um método rápido para a verificação e controle do processo. A utilização das placas Rodac possibilitou uma melhor recuperação de microrganismos do que a esponja na quantificação de mesófilos aeróbios, *E. coli* e *S.*

aureus. Após o uso de água quente houve redução da contaminação e, após o uso da amônia quaternária e do ácido peracético, não houve recuperação de *E. coli* e *S. aureus* em todas as superfícies avaliadas.

PALAVRAS CHAVES: ATP-bioluminescência, RODAC, contagem, mesófilos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

1 INTRODUÇÃO

O procedimento de higienização nos matadouros de aves consiste fundamentalmente no uso de água quente, detergentes e sanificantes (Contreras et al. 2003). Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir microrganismos alteradores e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (Moraes et al, 1997).

A atividade biológica de cerca de 500 agentes químicos pertencentes às séries da biguanida com os grupamentos substituídos tem sido avaliadas desde 1950, encontrando-se, entre eles, vários membros com ação letal sobre bactérias, fungos e vírus, que levaram à síntese química de uma série de derivados da bisbiguanida (Andrade; Macedo, 1996). Os compostos de amônia quaternária (*quats*) são largamente utilizados como anti-sépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbicida (McDonell; Russel, 1999). Os *quats* têm um alto poder bacteriostático, potencializado pela formação de filmes ou películas sobre a superfície, com poder residual longo por mais lisas que sejam estas superfícies (Wiest, 1984). O ácido peracético é um sanitizante que possui algumas vantagens, como não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, ter baixo impacto ambiental e ser relatado como eficaz contra biofilmes (Rossoni; Gaylarde, 2000).

Dentre os contaminantes da carne de aves, microrganismos patogênicos apresentam grande importância, por possuírem relevância como causadoras de doenças veiculadas por alimentos e, conseqüentemente, terem reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações.

As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre outros. A contagem padrão em placa tem sido utilizada como um indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação (Silva et al., 1997; Cardoso et al., 2000). Contagens altas indicam uma matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção, e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (Siqueira, 1995).

O *S. aureus* é um mau competidor e apresenta grande risco nos alimentos em que a microbiota normal foi destruída ou inibida, como em carnes defumadas ou salgadas, e a má conservação de alimentos em altas temperaturas é uma das principais causas das intoxicações por *Staphylococcus* (Rode et al., 2007).

O gênero *Escherichia*, juntamente com outras bactérias fermentadoras da lactose da família *Enterobacteriaceae*, como as dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme (Frazier, 1976; Silva; Junqueira, 1995). O habitat das bactérias que pertencem ao grupo coliforme é o trato intestinal do homem e de outros animais, entretanto, podem persistir por longos períodos e se multiplicarem em ambientes não fecais (Pardi et al., 1995; Jay, 2005). A *Escherichia coli* é a principal representante do grupo dos coliformes fecais, que são empregados como indicadores de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias deficientes (Delazari, 1998; Pardi et al., 1995; Siqueira, 1995).

Uma das formas de verificar a eficácia dos procedimentos de limpeza é o uso do método de placas Rodac (“replicate organism detection and counting”), que permite a replicação de organismos diretamente em Agar após contato com a superfície e emprega placas especiais que possuem um nível elevado de Agar (Jay, 2005).

Testes usando ATP-bioluminescência são largamente aceitos como método de monitoria do *status* higiênico-sanitário de linhas de produção de alimentos. A técnica de ATP-bioluminescência detecta células microbianas e resíduos de alimentos, os quais podem persistir após uma limpeza inadequada e ser uma origem de nutrientes para o crescimento microbiano (Corbitt et al., 2000).

Deste modo, foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias das superfícies das mesas de aço inoxidável, esteiras de poliuretano e placas de polietileno de uma sala de cortes de abatedouro avícola, utilizando a microbiologia convencional, por placas Rodac e esponja, e ATP-bioluminescência, para analisar a efetividade da água quente e

da ação de três princípios ativos (ácido peracético, amônia quaternária e biguanida) no processo de higienização, quantificando microrganismos mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e ATP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

O trabalho foi realizado na sala de cortes de um matadouro de aves no sul do Brasil, com capacidade de abate de mais de 20.000 aves por hora. Para analisar as condições higiênico-sanitárias, foram utilizadas microbiologia convencional (placas de contato - Rodac e esponja) e ATP-bioluminescência. As amostras foram coletadas no final do processamento dos cortes, na higienização pré-operacional: antes da lavagem das superfícies, sem a retirada dos resíduos; após a lavagem com água quente, entre 45°C e 50°C e pressão de 22,5 bar; e após lavagem com detergente a base de hidróxido de sódio a 2% (Power Foam[®], Johnson Diversey) com tempo de ação de 10 minutos, enxágüe com água entre 45°C e 50°C e pressão de 22,5 bar, e sanitização. Foram testados três sanitizantes: ácido peracético a 0,5% (Divosan Forte[®], Johnson Diversey), amônia quaternária a 2% (Divosan Divoquat Forte[®], Johnson Diversey) e biguanida a 1% (Divosan Divosept 350[®], Johnson Diversey), os quais tiveram tempo de ação de 15 minutos. As avaliações foram realizadas em três linhas de cortes de coxa de frango, ao mesmo tempo e de forma completamente casualizada, em três superfícies: mesas de aço inoxidável, esteiras de poliuretano e placas de polietileno. As coletas foram feitas em quatro repetições para cada uma das três superfícies. Deste modo, em cada superfície foram realizadas 36 análises de microbiologia convencional por esponja para as contagens de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus* e de microrganismos mesófilos aeróbios, 36 de placas de contato (Rodac) para cada ensaio (contagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e de microrganismos mesófilos aeróbios) e 36 de ATP-bioluminescência, totalizando 108 ensaios de cada metodologia/microrganismo.

2.2 Metodologia de coletas das amostras

2.2.1 Coletas utilizando esponja

As coletas de amostras das superfícies para realização dos ensaios por métodos de microbiologia tradicional foram realizadas baseando-se em Evancho et al (2001). Foram feitas por meio de esponja (Lenços umedecidos Laborclin[®], com 50 mL de água peptonada 0,1% com neutralizantes), a qual foi friccionada em cada tipo de superfície, de forma completamente casualizada, em uma área de 100 cm², delimitada por molde estéril.

2.2.2 Coletas utilizando ágar em placas de contato

Foram coletadas amostras das superfícies utilizando ágar em placas de contato (placas Rodac, com neutralizantes lecitina e Tween 80), baseando-se em Evancho et al (2001). As placas foram distribuídas de forma completamente casualizada, e cada ágar exposto foi mantido em contato com a superfície por 5 segundos, sob pressão.

2.2.3 Coletas utilizando *swabs* para ATP-bioluminescência

As coletas das superfícies foram realizadas utilizando metodologia baseada em Costa et al (2006) seguindo as recomendações do fabricante. A coleta foi feita por meio de *swabs* específicos para detecção de ATP por bioluminescência (*Swabs* LuciPac W, Kikkoman[®]). Os *swabs* foram friccionados, nos sentidos das diagonais, formando um ângulo de 30° com a superfície, em uma área de 100 cm², delimitada por moldes.

Todas as amostras coletadas foram transportadas sob refrigeração, em recipientes isotérmicos, até o laboratório.

2.3 Avaliação da contaminação nas superfícies da sala e nos cortes

2.3.1 Ensaios por microbiologia convencional com esponja

Segundo metodologia recomendada por Evancho et al (2001) e Swanson et al (2001), foram adicionados 50 mL de água peptonada tamponada a 0,1% na saqueta com esponja (Lenços umedecidos Laborclin[®], com neutralizantes), para a realização de diluições sucessivas.

2.3.1.1 Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios

Foi utilizada metodologia baseada em Evancho et al (2001), Swanson et al (2001) e Morton (2001), onde, a partir das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , foram inoculados 0,5 mL em superfície em ágar para contagem (PCA - Laborclin[®]). A leitura foi realizada após 48 horas de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados foram expressos em \log_{10} UFC.cm⁻².

2.3.1.2 Contagem de *Staphylococcus aureus*

A metodologia a seguir foi baseada em Evancho et al (2001) e Lancette; Bennett (2001). As diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} tiveram alíquotas de 0,1 mL inoculadas na superfície ágar Baird-Parker (Laborclin[®]). A leitura foi realizada após 30 - 48 horas de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi realizada a confirmação de *S. aureus* através de provas bioquímicas. Os resultados foram expressos em \log_{10} UFC.cm⁻².

2.3.1.3 Contagem de *Escherichia coli*

Foi utilizada metodologia baseada em Evancho et al (2001), Swanson et al (2001) e Kornacki; Johnson (2001), A partir das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} foram inoculadas alíquotas de 0,5 mL em superfície em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (Laborclin[®]). A leitura foi realizada após 18 - 24 horas de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Colônias típicas foram confirmadas por caldos seletivos e provas bioquímicas para *Escherichia coli*. Os resultados foram expressos em \log_{10} UFC.cm⁻².

2.3.2 Ensaios por microbiologia convencional com placas de contato (Rodac)

2.3.2.1 Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios

Foi utilizada metodologia baseada em Evancho et al (2001), Swanson et al (2001) e Morton (2001), utilizando o ágar PCA com neutralizantes em placas de contato (placas Rodac - Laborclin[®]). A leitura foi realizada após 48 horas de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados foram expressos em \log_{10} UFC.cm⁻².

2.3.2.2 Contagem de *Staphylococcus aureus*

A metodologia a seguir foi baseada em Evancho et al (2001) e Lancette; Bennett (2001), utilizando o agar Baird-Parker com neutralizantes em placas de contato (placas Rodac - Laborclin[®]). A leitura foi realizada após 30 - 48 horas de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi realizada a confirmação de *S. aureus* através de provas bioquímicas. Os resultados foram expressos em \log_{10} UFC.cm⁻².

2.3.2.3 Contagem de *Escherichia coli*

Foi utilizada metodologia baseada em Evancho et al (2001), Swanson et al (2001) e Kornacki; Johnson (2001), utilizando ágar cristal violeta vermelho neutro bile com neutralizantes em placas de contato (placas Rodac - Laborclin[®]). A leitura foi realizada após 18 - 24 horas de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Colônias típicas foram confirmadas por provas bioquímicas para *Escherichia coli*. Os resultados foram expressos em \log_{10} UFC.cm⁻².

2.3.3 Ensaio por ATP-Bioluminescência

Os *swabs* (*swabs* LuciPac W, Kikkoman[®]) tiveram suas extremidades quebradas para o reagente entrar em contato com a amostra. Em seguida, foram introduzidos no luminômetro para leitura da emissão de luz (Lumitester PD10N, Kikkoman[®]). Os resultados foram expressos em \log_{10} URL.cm⁻².

2.4 Análise estatística

Foram aplicados aos dados resultantes deste trabalho a análise da variância para o delineamento em blocos completos casualizados e o teste Tukey com 5 % de significância (COHort Software, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas coletas das diferentes superfícies, utilizando a metodologia de ATP-bioluminescência, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Log_{10} URL.cm⁻² de ATP em diferentes superfícies da sala de cortes de abatedouro de aves antes da higienização, após a lavagem com água quente e após os sanitizantes. Média das repetições.

Tratamentos	Superfícies		
	Mesas de aço inoxidável	Placas de polietileno	Esteiras de poliuretano
Antes da limpeza	2,29 A a	2,01 AB a	1,63 B ab
Após água quente	1,21 A bc	0,87 A b	0,93 A cd
Ácido peracético	0,51 AB cde	0,33 B bc	1,43 A abc
Amônia quaternária	-0,12 A e	0,33 A bc	0,52 A cd
Biguanida	1,10 A bcd	-0,57 B c	0,20 AB d

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Nas mesas de aço inoxidável, antes da limpeza, obteve-se a maior média de ATP, com diferença estatística frente aos demais tratamentos, demonstrando que tanto a água quente como os sanitizantes reduziram a carga orgânica desta superfície. A redução de ATP após o uso somente da água quente demonstrou diferença após o uso de amônia quaternária, mas foi semelhante ao ácido peracético e à biguanida. A amônia quaternária, no aço inoxidável, foi o sanitizante que obteve maior redução, apresentando diferença estatística com a biguanida, sendo estatisticamente semelhante ao ácido peracético.

Nas placas de polietileno, o momento em que a superfície se apresentou com maior contaminação foi antes da limpeza, com diferença estatística entre todos os outros tratamentos, como esperado. A utilização da água quente para a redução de ATP foi semelhante ao ácido peracético e à amônia quaternária, apresentando diferença somente com a biguanida, que levou a uma maior redução no valor de ATP nas placas de polietileno.

O valor de ATP após o uso do ácido peracético nas esteiras de poliuretano foi semelhante ao resultado de antes da limpeza, indicando uma possível falta de eficiência deste produto nesta superfície, ou uma alta contaminação nos locais das coletas, já que as linhas eram diferentes. Entretanto, o ácido peracético apresentou resultados

semelhantes ao uso da água quente e da amônia quaternária, com diferença estatística somente em relação à biguanida, que proporcionou maior redução na esteira de poliuretano, com resultado semelhante à amônia quaternária e após a água quente, e com diferença em relação à antes da limpeza e ao uso do ácido peracético.

Em relação aos tratamentos, os resultados obtidos antes da limpeza nas mesas de aço inoxidável foram semelhantes aos das placas de polietileno, enquanto os das esteiras de poliuretano foram diferentes do aço inoxidável e semelhantes aos das placas de polietileno. Após o uso da água quente e da amônia quaternária, os valores de ATP foram semelhantes nas três superfícies. O uso do ácido peracético demonstrou maior eficiência nas placas de polietileno, semelhante ao resultado obtido nas mesas de aço inoxidável e com diferença estatística quanto às esteiras de poliuretano. Os valores obtidos nas placas de polietileno, superfície que houve maior redução nos valores de ATP com o uso da biguanida, foram semelhantes aos da esteira de poliuretano e apresentaram diferença em relação ao aço inoxidável.

Numa indústria de produtos de origem animal, em especial a indústria de carnes e derivados, a limpeza e sanitização é uma prática de extrema importância no sentido de se evitar os fatores causadores da contaminação dos alimentos, que levam à perda das suas qualidades organolépticas e nutricionais, bem como a sua degradação, que pode ocasionar enfermidades de maior ou menor gravidade ao homem (Pardi et al., 2001).

Métodos rápidos, baseados no crescimento bacteriano e metabolismo, têm sido desenvolvidos usando os princípios da ATP-bioluminescência, biofísica, radiometria e impedância. A ATP-bioluminescência detecta a quantidade de ATP em superfícies de contato no processamento de alimentos bem como da própria amostra a ser analisada. O ATP detectado por esta técnica é derivado de microrganismos, células somáticas, plantas e animais, e vários equipamentos que usam os princípios da ATP-bioluminescência estão disponíveis comercialmente. O ATP reage com o complexo enzimático luciferina-luciferase e a luz emitida é medida por um luminômetro que a expressa em unidades relativas de luz (URL). Este método oferece resultados em tempo real, permitindo tomar ações imediatamente, como higienizar novamente as superfícies antes da utilização (Costa et al., 2006).

Existe a recomendação que, após a higienização, se obtenha o máximo de $1 \log_{10}$ URL.cm⁻², de acordo com Ukuku et al. (2001). O uso da água quente na higiene operacional foi suficiente para a redução da carga microbiana e de matéria orgânica nas esteiras e nas placas de polietileno. Entretanto, a amônia quaternária foi o único

sanitizante que obteve resultados menores que $1 \log_{10} \text{URL.cm}^{-2}$ em todas as superfícies testadas. Com os dispositivos de amostragem de ATP por bioluminescência, níveis extremamente baixos de contaminação podem ser detectados em segundos, permitindo uma rápida determinação da eficiência da limpeza e do estado de higiene de superfícies, validando os programas de controle, aumentando a segurança nos alimentos, melhorando a qualidade dos produtos e reduzindo os custos.

Conforme as recomendações do fabricante do equipamento Lumitester PD10N, utilizado neste experimento, sugere-se que sejam usados como referência, para a leitura de ATP-bioluminescência em superfícies, as seguintes medidas: menos que 50 URL ($1,7 \log_{10}$) podem ser considerados limpos; de 50 a 200 URL ($1,70 - 2,30 \log_{10}$) está relacionado com contaminação orgânica muito reduzida, provavelmente sem o crescimento de bactérias; de 200 a 500 URL ($2,30 - 2,70 \log_{10}$) a superfície está levemente suja, com contaminação tal que as bactérias poderão começar a crescer dentro de poucos dias; acima de 500 URL ($> 2,70 \log_{10}$) superfície suja, contaminação. Considerando estas sugestões, antes mesmo da lavagem com água a superfície da esteira de poliuretano poderia ser considerada limpa, e todos os demais tratamentos estariam de acordo, em todas as superfícies.

Kascová et al, 2007, utilizando o método ATP-bioluminescência para investigar a eficiência da limpeza e desinfecção em superfícies de corte de um abatedouro, observaram que, de 50 amostras analisadas, 80 % apresentaram contaminação $< 100 (< 2 \log_{10})$ URL, considerando como superfície limpa, 10% entre 100 e 300 (2 e $2,47 \log_{10}$) URL, sendo estas suspeitas, e 10% $> 300 (> 2,47 \log_{10})$ URL, considerando superfícies sujas. Estes dados estão de acordo com os encontrados no presente pesquisa, onde todos os pontos após o uso da água quente e dos sanitizantes apresentaram contaminação $< 2 \log_{10}$, inclusive a média dos pontos coletados na esteira de poliuretano antes da limpeza.

Costa et al. (2006), usaram a técnica do ATP-bioluminescência para avaliar os procedimentos de higienização de superfícies em aço inoxidável dos tanques de transporte de leite cru, de estocagem de leite cru resfriado, de equilíbrio de um pasteurizador, de estocagem de leite pasteurizado e para embalagem de leite pasteurizado e, ainda, a superfície interna de uma centrífuga de leite quanto à determinação de ATP (URL.cm^{-2}) e da contagem de mesófilos aeróbios (UFC.cm^{-2}). Considerando que valores menores que 150 ($< 2,17 \log_{10}$) URL eram considerados limpos, de 150 a 300 ($2,17$ a $2,47 \log_{10}$) URL eram considerados suspeitos, e acima de 300 ($> 2,47 \log_{10}$) URL em condições higiênicas inadequadas, a técnica do ATP-

bioluminescência apontou que 100% das superfícies estavam em condições higiênicas inadequadas, enquanto a contagem bacteriana indicou que apenas 50% estavam de acordo com as recomendações da APHA e 33% de acordo com a OMS.

Na comparação dos métodos placas Rodac e esponja, para avaliação da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, as superfícies apresentaram-se com diferenças relacionadas às metodologias. Os resultados obtidos nas coletas estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Utilização de placas Rodac e esponja para avaliação da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios de diferentes superfícies da sala de cortes de abatedouro de aves antes da higienização, após a lavagem com água quente e após os sanitizantes. Média das repetições.

Tratamentos	Superfícies					
	Mesas de aço inoxidável (UFC.cm ⁻²)		Placas de Poliétileno (UFC.cm ⁻²)		Esteiras de Poliuretano (UFC.cm ⁻²)	
	Rodac	Esponja	Rodac	Esponja	Rodac	Esponja
Antes da limpeza	2 AB a	-0,46 CD a	2 AB a	2,59 A a	1,23 ABC a	-1,46 D a
Após água quente	-0,48 BC bc	-1,53 C a	2 A a	-0,51 BC b	1,05 AB a	-1,70 C a
Ácido peracético	-1,85 A c	-1,19 A a	-2 A b	-1,70 A b	-0,12 A a	-1,70 A a
Am. quaternária ¹	-0,58 A bc	-1,70 A a	-2 A b	-0,81 A b	-0,48 A a	-1,20 A a
Biguanida	-0,21 A bc	-0,62 A a	-0,27 A b	-1,70 A b	0,45 A a	-0,46 A a

¹: Am. quaternária: amônia quaternária.

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Quando foram utilizadas as placas Rodac, nas mesas de aço inoxidável, houve diferença entre o resultado antes da limpeza e após o uso da água quente e sanitizantes. Não houve diferença entre os sanitizantes testados e o uso da água quente na redução dos microrganismos mesófilos, apesar da maior diminuição ter sido obtida pelo ácido peracético. Já com a microbiologia convencional com esponja não houve diferença entre nenhum tratamento.

Nas placas de polietileno, quando foram utilizadas as placas Rodac, a contaminação antes da limpeza e após a água quente foram semelhantes, e ambos foram diferentes dos sanitizantes, demonstrando que a sanitização foi efetiva para todos os produtos testados. O resultado obtido pelas coletas com esponja nas placas de polietileno foi o mais alto de todas as superfícies avaliadas, e apresentou diferença em relação aos demais tratamentos. A redução obtida pela água quente e pelos sanitizantes foi semelhante.

Não houve diferença entre os tratamentos quando os microrganismos mesófilos aeróbios foram avaliados pelas placas Rodac ou pela esponja, nas esteiras de poliuretano.

O maior número de microrganismo foi recuperado com o método microbiológico convencional com esponjas, nas placas de polietileno, antes da limpeza. O uso das esponjas nas mesas de aço inoxidável foi semelhante ao uso das placas Rodac e da esponja nas esteiras de poliuretano, e diferente das metodologias em outros pontos de coleta.

Avaliando o resultado das metodologias após a lavagem com água quente, a melhor recuperação de microrganismos mesófilos aeróbios foi obtida pelo método Rodac, nas placas de polietileno, o qual foi semelhante ao Rodac das esteiras de poliuretano. Este último foi similar ao Rodac nas mesas de aço inoxidável e à esponja nas placas de polietileno. Todas as análises de microbiologia convencional com esponja foram semelhantes entre si e ao método Rodac no aço inoxidável.

Após o uso dos sanitizantes ácido peracético, amônia quaternária e biguanida, não houve diferença estatística entre os métodos em nenhuma das superfícies avaliadas.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o processo de limpeza e sanitização utilizado na sala de cortes avaliada foi eficaz, pois a contaminação referente a microrganismos mesófilos aeróbios encontrada foi, em todos os pontos avaliados, menor que $1 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$ após o uso dos sanitizantes, com qualquer um dos princípios ativos testados. Esta avaliação está de acordo com a Decisão 471 da

Comunidade Européia (CE, 2001), a qual recomenda que, após a higienização, os níveis de mesófilos devam estar entre 0 a 10 UFC.cm⁻², ou seja, até 1 log₁₀ UFC.cm⁻². A Decisão descreve o método de placa de contato e a técnica da zaragatoa (*swab*) e/ou métodos ISO para as coletas de superfícies de processamento de carnes após a limpeza e desinfecção. Os resultados também demonstraram uma contaminação menor que a recomendada pela Decisão 471 (CE, 2001) após o uso da água quente, antes da sanitização, em alguns pontos avaliados, como na mesa de aço inoxidável. Entretanto, as placas de polietileno apresentaram altas contagens após a água quente pelo método Rodac.

Cabe ressaltar que na rotina de higienização de placas de polietileno em um abatedouro, não é utilizada somente água quente e que todas as placas passam pela sanitização antes de retornarem ao uso, sendo este procedimento realizado de forma manual ou automática. Diferentemente do que acontece com as mesas de aço inoxidável e as esteiras de poliuretano, nas quais são realizadas a higiene operacional com a remoção de resíduos e utilizando somente água quente sob pressão.

Métodos convencionais para detectar e monitorar a carga bacteriana em plantas de processamento de alimentos utilizam swabs em soluções e placas de contato, entre outros. Swabs ou esponjas são utilizados para remover a microflora das superfícies e a amostra líquida é plaqueada em Agar para contagem ou meios seletivos e os microrganismos podem ser identificados, tendo como maior desvantagem o tempo consumido (Chae; Schraft, 2001; Wirtanen et al., 1993).

Placas de contato amostram a superfície diretamente pela pressão do Agar solidificado contra a superfície. Este método é mais simples que o da esponja, mas não é possível utilizá-lo em superfícies irregulares ou rugosas, as quais normalmente abrigam biofilmes. A limitação deste método depende de quanta pressão é aplicada no Agar, o tempo de contato, a presença de sujidades, e se o agar consegue apreender a contaminação bacteriana. Microrganismos que não aderem quantitativamente à superfície do Agar durante a aplicação resultam na seleção de uma microflora específica ou em um número microbiano subestimado da superfície amostrada (Chmielewski; Frank, 2003).

Na comparação dos métodos placas Rodac e esponja, para avaliação da contagem de *Escherichia coli*, as superfícies apresentaram-se com poucas diferenças. Os resultados obtidos nas coletas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Utilização de placas Rodac e esponja para avaliação da contagem de *Escherichia coli* de diferentes superfícies da sala de cortes de abatedouro de aves antes da higienização, após a lavagem com água quente e após os sanitizantes. Média das repetições.

Tratamentos	Superfícies					
	Mesas de aço inoxidável (UFC.cm ⁻²)		Placas de Polietileno (UFC.cm ⁻²)		Esteiras de Poliuretano (UFC.cm ⁻²)	
	Rodac	Esponja	Rodac	Esponja	Rodac	Esponja
Antes da limpeza	-0,33 A a	-1,70 B a	-2 B a	-1,70 B a	-2 B a	-1,70 B a
Após água quente	-2 A b	-1,70 A a	-1,67 A a	-1,70 A a	-1,90 A a	-1,70 A a
Ácido peracético	-2 A b	-1,70 A a	-2 A a	-1,70 A a	-2 A a	-1,70 A a
Am. quaternária ¹	-2 A b	-1,70 A a	-2 A a	-1,70 A a	-2 A a	-1,70 A a
Biguanida	-2 A b	-1,70 A a	-1,70 A a	-1,70 A a	-1,77 A a	-1,70 A a

¹: Am. quaternária: amônia quaternária.

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e de mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Nas mesas de aço inoxidável, onde foram utilizadas as placas Rodac, houve diferença entre o resultado antes da limpeza e após o uso da água quente e sanitizantes. Não houve diferença entre os sanitizantes testados e o uso da água quente em relação à *Escherichia coli*, já que houve ausência do agente na superfície em todos os tratamentos. Na microbiologia convencional com esponja não houve diferença entre nenhum tratamento. Nas placas de polietileno e nas esteiras de poliuretano não houve

diferença entre os tratamentos em nenhum dos métodos avaliados, em relação à quantificação de *E. coli*.

Em relação aos métodos Rodac e esponja, a melhor recuperação de *E. coli* foi pelas placas Rodac, nas mesas de aço inoxidável, antes da limpeza, a qual apresentou diferença estatística em relação aos métodos utilizados em todos os outros pontos de coleta neste tratamento. Nos demais tratamentos, não houve diferença estatística entre os métodos quanto a todos os pontos de coleta.

Em alguns pontos de coleta houve isolamento de *E. coli*, como através do método Rodac, antes da limpeza, na mesa de aço inoxidável. Após o uso da água quente e dos sanitizantes não houve mais recuperação de *E. coli*, demonstrando eficácia dos processos. Apesar da utilização de quatro pontos de coleta representando cada tratamento, não foi possível a recuperação de *E. coli* antes da limpeza das superfícies de polietileno e poliuretano, provavelmente devido ao fato de haver grande contaminação nas placas Rodac provenientes destes locais, o que dificultou o isolamento de colônias puras de *E. coli*. Tanto nas placas de polietileno como nas esteiras de poliuretano, pelas placas Rodac, houve o isolamento de *E. coli* nas amostras coletadas após o uso da água quente. Houve recuperação de *E. coli* após o uso da biguanida, demonstrando sua ineficácia para este agente nas condições testadas. Após o uso do ácido peracético e da amônia quaternária não houve recuperação de *E. coli*.

As placas Rodac podem ser utilizadas em um programa de monitoramento e verificação para determinar se os níveis bacterianos de superfícies lisas e não porosas estão em limites seguros. A utilização deste método é aconselhada principalmente após a sanitização, quando as superfícies se encontram com menor contaminação, propiciando a leitura das placas após incubação (Snyder, 2003).

Não houve isolamento de *E. coli* através da microbiologia convencional na coleta por esponjas, provavelmente devido ao baixo número destas bactérias nas superfícies amostradas, não sendo recuperadas pelo método.

Na análise estatística realizada com os dados obtidos a partir da quantificação de *Staphylococcus aureus*, excetuando-se a interação tratamentos e metodologias, que foi significativa ($P < 0,05$), a análise da variância não revelou interação entre superfícies e tratamentos e entre superfícies e metodologias. Os resultados obtidos nas coletas para a comparação dos métodos placas Rodac e esponja, para avaliação da contagem de *Staphylococcus aureus*, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Utilização de placas Rodac e esponja para avaliação da contagem de *Staphylococcus aureus* em UFC.cm⁻² antes da higienização, após a lavagem com água quente e após os sanitizantes. Média das repetições.

Tratamentos	Metodologias	
	Rodac	Esponja
Antes da limpeza	- 0,99 A a	-1,00 A a
Após água quente	- 1,90 B b	-1,00 A a
Ácido peracético	-2,00 B b	-1,00 A a
Amônia quaternária	-2,00 B b	-1,00 A a
Biguanida	-2,00 B b	-1,00 A a

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e de mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Ao analisar os resultados na metodologia com placas Rodac, a média obtida antes da limpeza foi diferente estatisticamente dos demais tratamentos. Houve recuperação de *S. aureus* após a água quente, mas não após o uso dos sanitizantes, demonstrando a eficácia na redução do microrganismo.

Nas coletas realizadas com a esponja não houve diferença entre os tratamentos, e não houve recuperação de *S. aureus*, provavelmente devido ao fato de que os microrganismos coletados eram diluídos em 100 mL de água peptonada a 0,1% para dar início aos ensaios. A metodologia utilizada para este microrganismo preconiza a utilização de um inóculo de 100 µL nas placas, de cada diluição, e deveria haver um baixo número de *S. aureus* nas áreas das superfícies amostradas, que não foram recuperados pelo método.

Na comparação entre os métodos, antes da limpeza, não houve diferença estatística. Contudo, houve o isolamento de *S. aureus* pelo método Rodac e não pelo método de esponja. Após o uso da água quente e dos três sanitizantes houve diferença entre os métodos, apesar de que, após os sanitizantes, não houve isolamento de *S. aureus* por nenhum dos dois métodos. Ambos os valores da tabela (-2 para Rodac, -1 para a esponja) representam a não detecção do microrganismo pelo método em questão, devido ao limite de quantificação ser diferente.

Um dos principais fatores que contribuem na contaminação das superfícies na sala de corte é a contaminação dos cortes, a qual está diretamente relacionada à

eficiência do processo de abate. Rodrigues et al (2008), estudando a contaminação das carcaças de frangos de corte nas diferentes etapas do processo de abate, verificou uma redução significativa na contagem de aeróbios mesófilos, coliformes totais e coliformes termotolerantes após o pré-resfriamento das carcaças. Além disso, estes autores, embora não tenham encontrado diferença significativa na contaminação de *E. coli* nas diferentes etapas de abate avaliadas encontraram, após o pré-resfriamento, uma baixa contaminação por este agente ($0,1 \log_{10}$ UFC.cm⁻² de carcaça).

Olsen et al. (2003) investigou *Salmonella* em superfícies de um abatedouro avícola e a subsequente contaminação cruzada. Todos os equipamentos de um ponto de controle na linha de abate testada foram positivos ao menos uma vez e a área de recebimento foi a mais contaminada. O número de amostras positivas nas seções de abate, evisceração e processamento de miúdos, resfriamento, processamento final e área de embalagem indicam que a contaminação é reduzida ao final do processamento. Deste modo, os resultados obtidos no presente experimento, com a baixa recuperação de *E. coli* e de *S. aureus*, podem estar relacionados com o mencionado por Olsen et al. (2003), já que a amostragem foi na sala de cortes, um dos ambientes com menor contaminação em um abatedouro.

A redução significativa de microrganismos nas superfícies após a limpeza, encontradas neste trabalho, demonstraram a importância da higiene operacional na manutenção da contaminação abaixo dos limites recomendados. Gibson et al. (1999), avaliando o efeito da limpeza com detergentes e água a temperatura ambiente com diferentes pressões, em um programa de sanitização em uma indústria de alimentos, observaram uma redução na contaminação microbiana nas superfícies de $1 \log_{10}$. Já Dunsmore et al. (1981), observaram que a contaminação microbiana após a limpeza com detergentes e água sob pressão, em superfícies de aço inoxidável, foi reduzida em 99,8 % (aproximadamente $3 \log_{10}$). No presente trabalho foram obtidos resultados semelhantes a estes autores, com a contaminação nas superfícies reduzida de 1 a $3 \log_{10}$ após a fase de limpeza somente com água entre 45°C e 50°C e pressão de 22,5 bar, na maioria dos pontos avaliados, principalmente em relação aos microrganismos mesófilos aeróbios.

Os desinfetantes avaliados neste trabalho (amônia quaternária, ácido peracético e biguanida), são comumente utilizados na sanitização de sala de corte nos frigoríficos no Brasil. Os resultados demonstraram que não houve uma diferença significativa nos pontos avaliados e que, após a sua aplicação todas as superfícies apresentaram

contaminação abaixo do recomendado pela Normativa Européia, em relação à contagem de microrganismo mesófilos aeróbios. Resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados por Frank e Chmielewski (1997) que, avaliando a eficiência de compostos a base de amônia quaternária na concentração de 200 p.p.m. em superfícies de aço inoxidável e policarbonato liso, verificaram uma contaminação menor que 5 UFC.cm⁻² após a desinfecção. Kascová et al. (2007), avaliando a eficiência dos compostos a base de amônia quaternária na concentração de 0.5% em superfícies de abatedouros, verificaram uma redução na contaminação de 99,2% após sua aplicação. Neste experimento, após o uso da amônia quaternária e do ácido peracético, em todas as superfícies avaliadas, não houve mais recuperação de *E. coli* e *S. aureus*.

A utilização de diferentes métodos de análise para monitorar o status higiênico-sanitário de superfícies em contato com cortes de frango permite uma maior flexibilidade em relação ao controle da higienização. A utilização do método para detecção de ATP por bioluminescência proporciona indicadores relacionados à imediata eficácia do processo de higienização, e a microbiologia convencional proporciona indicadores de contaminação microbiológica nas superfícies de um estabelecimento. Ambos os métodos são aplicáveis em programas de monitoria de condições higiênico-sanitárias de superfícies de contato com alimentos, desde que se determine qual o propósito de cada um. Conciliar o uso de ambas, como ATP-bioluminescência e placas Rodac, por exemplo, em dias e turnos alternados da semana, podem trazer benefícios ao controle do processamento das aves, tornando possível a tomada de medidas corretivas imediatas após os procedimentos de higienização, quando se utiliza ATP-bioluminescência, e tomando conhecimento dos níveis de microrganismos que contaminam as superfícies e quais são os patogênicos que persistem após a higienização, quando utilizar a microbiologia tradicional.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J; MACÊDO, J. A. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, on-line, São Paulo, v.67, n.1, jan-junho, 2000. Disponível:

http://www.biologico.br/arquivos/v.67_1/pesquisa_salmonella . Consultado em 12 de janeiro de 2006. ISSN 0020-3653.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiol**, v.18, p.103-112, 2001.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive reviews in food science and food safety. **Institute of Food Technologists**, v. 2, p. 22-32, 2003.

COHort Software. CoStat. www.cohort.com.monterey, Califórnia, 2003

COMUNIDADE EUROPÉIA. Decisão 471 de 08 de junho de 2001. Estabelece Regras para os Controles Regulares à Higiene Geral Efetuada pelos Operadores aos Estabelecimentos Exportadores de Carne.

CONTRERAS, C.J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo. Ed. Varela, 2003, 181p.

CORBITT, A.J.; BENNION, N.; FORSYTHE, S.J. Adenylate kinase amplification of ATP-bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 443-447, 2000.

COSTA, P.D. ; ANDRADE, N.J. ; SOARES, N.F.F.; PASSOS, F.J V.; BRANDÃO, S.C.C. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 345-349, 2006.

DELAZARI, I. **Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves**. In: Semana Acadêmica Veterinária, 8., 1998, São Paulo. Anais. São Paulo: 1998. p.71-77.

DUNSMORE, D.G.; TWOMEX, A.; WHITTLESTONE, W.G.; MORGAN, H.W. Design and performance of systems for cleaning product contact surfaces of food equipment : a review. **Journal of food protection**, v. 44, p. 220 – 240, 1981.

EVANCHO, G.M.; SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; FRANK, J.F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed., Washington: American Public Health Association, p. 25-35, 2001.

FRANK, J. F.; CHMIELEWSKI, R. A.. Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *Journal Food Protection*, v.60, p. 43-47, 1997.

FRAZIER, N.C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 512p.

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.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre, 6 ed.: Artmed, 2005. 711 p.

KASKOVÁ, A.O., ONDRASOVICOVÁ, M., VARGOVÁ, M., ONDRASOVIC, AND J., VENGLOVSKÝ. Application of peracetic acid and quaternary ammonium disinfectants as a part of sanitary treatment in a poultry house and poultry processing plant. **Zoonoses Public Health**, v.54, p.125–130, 2007.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed., Washington: American Public Health Association, p. 69-82, 2001.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed., Washington: American Public Health Association, p. 387-403, 2001.

McDONELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Rev.** v. 12, p. 147-179, 1999.

MORAES, M.S.V.; ANDRADE, N.J.; CHAVES, J.B.P.; PASSOS, F.J.V.; GOMIDE, L.A.M. Isolament of aerobic mesophilic and thermophilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.17, p.325-329, 1997.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed., Washington: American Public Health Association, p. 63-67, 2001.

OLSEN, J.E.; BROWN, D.J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. (2003). Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, 826–835.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: riscos microbiológicos da carne**, Goiânia: UFG, 1995. v.1, p.294-308.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.116 (3), p.372-383, 2007.

RODRIGUES, A.C.A.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M.S.; NERO, L.A. Analysis and monitoring of critical points in the poultry slaughter using microbiological indicators. **Ciência Rural**, v.38, p.1948-1953, 2008.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.

SILVA, N. ; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1995. 228 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159 p.

SNYDER, P.O. Foodservice HACCP. **Foodservice Research International**. v. 13, p. 227-267, 2003.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed., Washington: American Public Health Association, p. 53-62, 2001.

UKUKU, D.O.; PILIZOTA, V.; SAPERS, G.M. Bioluminescence ATP assay for estimating total plate counts of surface microflora of whole cantaloupe and determining efficacy of washing treatments. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 813-819, 2001.

WIEST, J.M. Desinfecção e desinfetantes. In: GUERREIRO, et al. **Bacteriologia especial: com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984. cap. 5. p. 51-66.

WIRTANEN G, MATILLA-SANDHOLM T. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless steel surfaces. **Journal of Food Protection**, 56(8):678-83, 1993.

4.6 TRABALHO 6

Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse

Laura Beatriz Rodrigues^{I, II*}; Luciana Ruschel dos Santos^I; Vinícius Zancanaro Tagliari^I; Natalie Nadin Rizzo^I; Graciela Trenhago^I; Amauri Picollo de Oliveira^I; Franciane Goetz^I; Vladimir Pinheiro do Nascimento^{II}

^IFaculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo;

^{II}Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ABSTRACT

This study assessed biofilm formation on polystyrene by *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *L. welshimeri* and *Escherichia coli*, isolated from a slaughtering plant. Microorganisms were grown on tryptic soy agar (TSA) and transferred to tryptic soy broth (TSB) containing 0.5 % of sodium chloride, without glucose, and supplemented with 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5 and 4% of glucose, incubated at 36°C for 24 hours. The cultures were inoculated into polystyrene microtiter plates, and were incubated, rinsed, fixed with methanol, stained with Hucker's crystal violet 2%, having their absorbance read at 550 nm. The 11 strains of *Staphylococcus aureus* formed biofilm on polystyrene at least at one of the concentrations tested, strongly producing biofilm in TSB 2% (1 strain), 3% (1 strain), 3.5% (3 strains) and 4% of glucose (5 strains). The six strains of *Listeria* produced biofilm moderately at all concentrations of glucose, except for those grown on TSB with 1.5% of glucose, where they either did not produce biofilm or were weak biofilm producers. A strain, grown on TSB with 3.5% of glucose, was the only *L. monocytogenes* that strongly produced biofilm. The nine strains of *Escherichia coli* produced biofilm at least at one of the concentrations and turned out to be strong biofilm producers when grown on TSB with 0% (3 strains), 3.5 % (1 strain) and 4% of glucose (1 strain). Microorganisms isolated from the slaughtering plant are able to produce biofilm.

Keywords: *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, biofilm, polystyrene

Quantificação da formação de biofilme em poliestireno por *Listeria*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados de superfícies de abatedouro avícola

RESUMO

Este trabalho avaliou a formação de biofilme em poliestireno por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *L. welshimeri* e *Escherichia coli*, isoladas de abatedouro avícola. Os microrganismos foram cultivados em agar TSA e transferidos para caldo TSB com 0,5 % de cloreto de sódio, sem glicose e suplementado com 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4 % de glicose, incubados a 36°C por 24 horas. As culturas foram inoculadas em placas de microtitulação de poliestireno, e foram incubadas, lavadas, fixadas com metanol, coradas com cristal violeta de Hucker 2% e tiveram a absorbância lida a 550 nm. As 11 amostras de *Staphylococcus aureus* formaram biofilme no poliestireno em pelo menos uma das concentrações testadas, sendo fortemente formadoras em caldo TSB com 2 % (1 amostra), 3 % (1 amostra), 3,5 % (3 amostras) e 4 % de glicose (5 amostras). As seis amostras de *Listeria* demonstraram-se moderadamente formadoras de biofilme em todas as concentrações de glicose testadas, exceto as cultivadas em TSB com 1,5 % glicose, no qual foram não formadoras e fracamente formadoras. Uma amostra, cultivada no caldo TSB com 3,5 % de glicose, foi a única *L. monocytogenes* considerada fortemente formadora de biofilme. As nove amostras de *Escherichia coli* formaram biofilme em pelo menos uma das concentrações testadas, e foram fortemente formadoras quando cultivadas em caldo TSB com 0 % (3 amostras), 3,5 % (1 amostra) e 4 % de glicose (1 amostra). Demonstrou-se que os microrganismos isolados do abatedouro avícola possuem a capacidade de formar biofilme.

Palavras-chave: *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, biofilme, poliestireno

INTRODUCTION

A biofilm is a population of microbial cells growing on a surface and enclosed in an amorphous extracellular matrix. Biofilm formed in food processing environments is of special importance as it has the potential to act as a chronic source of microbial

contamination that may lead to food spoilage or transmission of diseases, and bacteria in biofilms exhibit enhanced resistance to cleaning and sanitation (18).

A considerable number of both spoilage and pathogenic microorganisms are able to participate at a higher or lower intensity in both adhesion processes and biofilm formation. *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* spp and *Enterococcus faecium* are some of the spoilage microorganisms whereas *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* belong to the pathogenic group (11). The adhesion of bacteria to host tissue is the first step in pathogenesis. Similarly, bacterial adhesion to inanimate surfaces is the first step in the formation of biofilms - a real problem in industrial processes and medical devices (23).

Although measurement of bacterial adhesion is important, especially when agents used to prevent adhesion are developed, a relative small number of techniques can be used for such purpose (23). Formation and presence of biofilm have been investigated by different quantification methods, among which the microtiter plate system is widely used (1, 18-20). Microtiter plate systems for quantifying biofilm formation have been investigated using many different organisms and stains (1, 2, 19). Therefore, this study assessed biofilm formation on polystyrene plates by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *L. welshimeri* isolated from the cutting room of a slaughtering plant and grown on tryptic soy broth (TSB) using different glucose concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

This study was conducted in the cutting room of a poultry slaughterhouse in southern Brazil with capacity for 20,000 animals per hour. Samples were collected at the end of the cutting phase, during preoperational cleaning: before the surfaces were washed; after washing with hot water and after washing with 2% sodium hydroxide detergent (Power Foam[®], Johnson Diversey), rinsing and disinfection with 0.5% peracetic acid (Divosan Forte[®], Johnson Diversey), 2% quaternary ammonium (Divosan Divoquat Forte[®], Johnson Diversey), and 1% biguanide (Divosan Divosept 350[®], Johnson Diversey). Evaluations were made in three processing lines for cutting chicken legs at the same time and on fully randomized sites of three surfaces: stainless steel

tables, polyurethane conveyors, and polyethylene plates. Samples were collected four times for each of the three surfaces and 36 analyses were performed for each assay, totaling 108 assays for each microorganism. The following methods were used: Evancho *et al.* (4), Hitchins (8), and Ryser and Donnelly (16) for investigation of *Listeria sp*; Evancho *et al.* (4) and Lancette and Bennett (10) for counting *Staphylococcus aureus*, and Evancho *et al.* (4), Swanson *et al.* (21) and Kornacki and Johnson (9) for *Escherichia coli*. The bacteria recovered in this experiment and used to verify biofilm formation are described in Table 1.

Assessment of biofilm formation on polystyrene microtiter plates

The method was based on the techniques described by Stepanovic *et al.* (19, 20), adapted for the analysis of *Listeria sp* (6 strains), *Escherichia coli* (9 strains) and *Staphylococcus aureus* (11 strains). The standard strains used were *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The strains were grown on tryptic soy agar (TSA) without dextrose (Difco) using 1.5% of agar, without glucose (0%), and on TSA supplemented with 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5 and 4% of glucose, incubated at 36°C for 24 hours and transferred to tryptic soy broth (TSB) without dextrose (Difco), with 0.5% of sodium chloride, using the same glucose concentrations and incubation at 36°C for 24 hours. Thereafter, aliquots of the cultures were added to the TSB using the same glucose concentration until MacFarland scale 1 was obtained.

Later, 200 µL of each bacterial suspension were inoculated, in triplicate, onto 96-well, flat-bottomed sterile polystyrene microtiter plates (Cral). Non-inoculated TSB wells, in triplicate, at each glucose concentration, were used as negative controls. The plates were incubated at 36°C for 24 hours. The bacterial suspension was aspirated and each well was washed three times with 250 µL of sterile physiological saline at 0.9%. After that, the biofilm was fixed with 200 µL of methanol for 15 minutes, and later removed. The plates were dried at ambient temperature, stained with 200 µL of Hucker's crystal violet solution at 2% for 5 minutes, washed in running water and dried at ambient temperature. Afterwards, absorbance was read using an ELISA plate reader (Rosys Anthos 2010) at 550 nm.

The optical density (OD_s) of each strain was obtained by the arithmetic mean of the absorbance of three wells and this value was compared with the mean absorbance of negative controls (OD_{nc}). The following classification was used for the determination of biofilm formation: no biofilm production ($OD_s \leq OD_{nc}$), weak biofilm production ($OD_{nc} < OD_s \leq 2 \cdot OD_{nc}$), moderate biofilm production ($2 \cdot OD_{nc} < OD_s \leq 4 \cdot OD_{nc}$) and strong biofilm production ($4 \cdot OD_{nc} < OD_s$).

RESULTS AND DISCUSSION

All *Staphylococcus aureus* strains analyzed produced biofilm on polystyrene at least at one of the concentrations used. The strains were strong biofilm producers when grown on TSB with 2% (1 strain), 3% (1 strain), 3.5% (3 strains) and 4% of glucose (5 strains), as described in Table 2.

Strains S4 and S6, obtained from polyethylene plates containing poultry meat residues, before washing with water, were strong biofilm producers on polystyrene in media with 3.5% and 4% of glucose. Strains S8 and S9 were obtained from stainless steel tables before washing. Strain S8 was a strong biofilm producer in the broth with 2% of glucose and strain S9 was a strong biofilm producer in broths with 3% and 4% of glucose. Isolates S15 and S16 were obtained from polyurethane conveyors, collected after washing with hot water. S15 was a strong biofilm producer in the medium with 4% of glucose, and S16 was a strong biofilm producer in broths with 3.5% and 4% of glucose.

Rode et al. (14) assessed biofilm production by *S. aureus* using polystyrene microplate quantification to test the TSB used without supplementation and with concentrations of 0.16; 0.31; 0.63; 1.25; 2.5; 4; 5; 6; 8 and 10% of glucose and sodium chloride (NaCl), among other factors, such as temperature, incubation time and growth medium. The authors mention that the optimal concentration of NaCl and glucose for biofilm production ranges between 1.5% and 6%, and that the combination of NaCl and glucose in the culture medium increased biofilm formation by *S. aureus*. Levels of CO_2 , anaerobiosis, NaCl, glucose, ethanol and osmotic stress can influence biofilm production (5, 12).

With regard to *S. aureus* strains investigated in this experiment, there was a larger number of strong biofilm producers when grown in media with concentrations of 3.5 % and 4% of glucose. Thus, one may suppose that higher glucose concentrations stimulated biofilm production by these strains.

The strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria welshimeri* analyzed showed adhesion to polystyrene at nearly all concentrations (Table 2). The strains of *Listeria* were moderate biofilm producers at all glucose concentrations, except for the strains grown on TSB at 1.5% of glucose, in which the strains did not produce biofilm or were weak biofilm producers. Strain L6, grown on TSB at 3.5 % of glucose, obtained from polyurethane conveyors and collected after washing with hot water, was the only *Listeria monocytogenes* strain that showed strong biofilm production.

Biofilm production on a plastic surface was quantified in 48 strains of *Listeria monocytogenes* by Stepanovic et al. (18), using brain heart infusion (BHI), TSB, meat broth (MB) and 1/20 diluted TSB (1/20-TSB) in plastic microtiter plates. All tested *L. monocytogenes* strains produced biofilm. However, the nutrient content of the medium significantly influenced the quantity of biofilm produced. *L. monocytogenes* produced the highest quantities of biofilm in BHI, followed by TSB, then MB, and the smallest quantities of biofilm were produced in 1/20-TSB. Thus, the researchers concluded that *L. monocytogenes* produces more biofilm in the nutrient-rich medium.

Even though only one of the strains tested in our study was a strong biofilm producer on polystyrene in TSB with 3.5% of glucose, the *Listeria* strains analyzed produced biofilm in all the other media, being classified as moderate biofilm producers.

Several factors play a role in biofilm production, and the different effects of nutrient content of the growth media on its formation may be a response of the microorganism to environmental conditions as a result of mutations in genes that control biofilm formation (15).

The strains of *Escherichia coli* analyzed showed adhesion to polystyrene at least at one of the concentrations tested. They were strong biofilm producers when grown in

TSB with 0% (3 strains), 3.5% (1 strain) and 4% of glucose (1 strain), as shown in Table 2.

Strains C2, C3 and C4 were obtained from stainless steel tables containing poultry meat residues, before washing with water, and turned out to be strong biofilm producers on polystyrene in TSB with 0% of glucose. Strain C1, also obtained from stainless steel tables before washing, were strong biofilm producers in the broth with 3.5% and 4% of glucose.

The capacity of biofilm production by *Escherichia coli* O157:H7 in environments with few nutrients was demonstrated by Dewanti and Wong (3), who grew it in minimal salts medium (MSM) supplemented with 0.01% of glucose, and observed biofilm formation on stainless steel chips. Biofilms were also developed by *E. coli* O157:H7 on stainless steel chips in TSB, 1/5 dilution of TSB, 0.1% Bacto peptone (BP) and MSM supplemented with 0.04% of one of the following carbon sources: glucose, glycerol, lactose, mannose, succinic acid, sodium pyruvate or lactic acid. These researchers asserted that biofilms developed faster and that a higher number of adherent cells were recovered when the organisms were grown in low nutrient media. Regardless of the carbon source, biofilms developed in MSM consisting of shorter bacterial cells and thicker extracellular matrix, with glucose as the best substrate for stable biofilm formation.

The models studied by Ghazani *et al.* (6) using *E. coli* O₁₁₁ indicate that the bacteria found in food processing environments can be highly resistant and difficult to eliminate. Bacterial adhesion and subsequent survival of bacteria include interactions between the bacterial cell, the surface and the surrounding microenvironment. The same researchers note that an effective cleaning and sanitation program, if included in the process from the very beginning, usually prevents the accumulation of particles and bacteria on the surface of equipment and subsequent biofilm formation.

The assessment of biofilm formation on microtiter plates has been used in several studies, with different media as nutrient source, among which TSB is most widely employed (13, 14, 18-20, 22).

Tiba *et al.* (22) used the polystyrene microplate system to assess biofilm formation by *E. coli* isolated from cases of cystitis in women. Of 100 analyzed strains, 44 were moderate or strong biofilm producers, whereas 56 strains did not produce biofilm or were weak producers.

Biofilm quantification began with culturing of biofilms in test tubes and their subsequent staining for detection and identification. After that, the microtiter plate wells were used as growth vessels, and the results were measured by spectrophotometry. Different methods can be used, such as test tubes, microtiter plates, radiolabeling, microscopy, Congo red agar plate test, among others. However, the microtiter plate method is still widely used for assessing biofilm production (13, 20).

By using the polystyrene microtiter plate method, it was possible to find out that all strains of *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* had the capacity to produce biofilm, even if they are weak producers, in at least one of the growth media tested.

The strains of *S. aureus* were strong biofilm producers in TSB with higher glucose concentrations, in line with the results obtained by other authors (14, 19, 20). *S. aureus* is a poor competitor and has a high potential for contamination of foods in which the normal microbiota was destroyed or inhibited, as in smoked or salted meats, and poor food preservation at high temperatures is one of the major causes of food poisoning by *Staphylococcus* (14). In this study, as *S. aureus* strains were obtained from polyethylene plates, from polyurethane conveyors and from stainless steel tables, surfaces that are in contact with poultry cuts at the slaughterhouse may contaminate these foods and cause diseases in consumers, if the food items are mishandled by them.

Although hygiene conditions for food production have been continuously improved in food industries, outbreaks of listeriosis caused by the consumption of contaminated products may occur, and therefore, providing an effective control of *Listeria* spp. has been a challenge (7). The strains of *L. monocytogenes* and *L. welshimeri* analyzed were obtained from stainless steel tables and from polyurethane conveyors, and showed weak and moderate biofilm formation in TSB with different glucose concentrations, but especially in media with 2 to 4% of glucose. An *L.*

monocytogenes strain isolated from the polyurethane conveyor was a strong biofilm producer in TSB with 3.5% of glucose. These results were consistent with those obtained by Stepanovic *et al.* (18), who concluded that *L. monocytogenes* produces more biofilm in nutrient-rich media.

Escherichia coli can cause several diseases, but outbreaks of gastroenteritis play a key role (17). The strains of *E. coli* assessed were obtained from stainless steel tables, from polyethylene plates and from polyurethane conveyors, and were capable of forming biofilm in media with the tested glucose concentrations. The *E. coli* strains isolated from stainless steel tables were strong biofilm producers in TSB with 0% of glucose, that is, in an environment with nutrient deprivation, as may be the case of surfaces in food industries, such as poultry slaughterhouses, and as demonstrated by Dewanti and Wong (3) for *E. coli* O157:H7. Nevertheless, an *E. coli* strain, also obtained from stainless steel tables, was a strong biofilm producer in TSB with 3.5% and 4% of glucose, thus showing the different ways whereby biofilm can be produced by *E. coli*. Among the analyzed bacteria, two were recovered from the polyethylene plate and from the polyurethane conveyor after the application of a sanitizing agent (1% biguanide). However, these *E. coli* strains were weak or moderate biofilm producers in the media assessed, on polystyrene surface, but strong biofilm production was expected as the strains were isolated after sanitation. Supposedly, the results obtained for these microorganisms with regard to biofilm production may change depending on the surface and on the detection method used (23).

The data obtained in this study are very important because they show that *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from surfaces in contact with foods in the cutting room of a poultry slaughterhouse can produce biofilm, which may cause the persistence of these microorganisms during food processing and consequently lead to greater risks of food contamination, jeopardizing consumers' health. Further studies are still needed to determine on which surfaces and under which environmental conditions these microorganisms produce more biofilm.

ACKNOWLEDGEMENTS

We express our thanks to the Center for Food Research and to the Laboratory of Virology and Immunology of the School of Agronomics and Veterinary Medicine, Universidade de Passo Fundo, Brazil.

REFERENCES

1. Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M.; Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996–1006.
2. Deighton, M.A.; Balkau, B. (1990). Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2442–2447.
3. Dewanti, R.; Wong, A.C.L. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 26(2), 147-164.
4. Evancho, G.M.; Sveum, W.H.; Moberg, L.J.; Frank, J.F. (2001). Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Downes, F.P.; Ito, K. (eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed., American Public Health Association, Washington, p. 25-35.
5. Fitzpatrick, F.; Humphreys, H.; O’Gara, J.P. (2005). Evidence for ica ADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1973–1976.
6. Ghazani, M.H.M.; Karami, A.R.; Dolgharisharaf, J. (2009). Biofilm formation of *Escherichia coli* O₁₁₁ on cement surfaces. *Res. J. Biol. Sci.* 4(1), 113-115.
7. Harvey, J.; Keenana, K.P.; Gilmoura, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* 24, 380–392.
8. Hitchins, A.D. (2003) Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: *BAM. Bacteriological Analytical Manual*. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>.
9. Kornacki, J.L.; Johnson, J.L. (2001). Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F.P.; Ito, K. (eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed., American Public Health Association, Washington, p. 69-82.

10. Lancette, G.A.; Bennett, R.W. (2001). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Downes, F.P.; Ito, K. (eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed., American Public Health Association, Washington, p. 387-403.
11. Marques, S.C.; Rezende, J.G.O.S.; Alves, L.A.F.; Silva, B.C.; Alves, E.; Abreu, L.R.; Piccoli, R.H. (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol.* 38, 538-543.
12. O'Gara, J.P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 179–188.
13. Pitts, B.; Hamilton, M.A.; Zilver, N.; Stewart, P.S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods.* 54, 269– 276.
14. Rode, T.M.; Langsrud, S.; Holck, A.; Moretro, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 116(3), 372-383.
15. Römling, U.; Sierralta, W.D.; Eriksson, K.; Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* 28, 249–264.
16. Ryser, E.T.; Donnelly, C.W. (2001). *Listeria*. In: Downes, F.P.; Ito, K. (eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed., American Public Health Association, Washington, p. 343-356.
17. Scavia, G.; Staffolani, M.; Fisichella, S.; Striano, G.; Colletta, S.; Ferri, G.; Escher, M.; Minelli, F.; Caprioli, A. (2008). Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. *J. Med. Microbiol.* 57, 1141-1146.
18. Stepanovic, S.; Irkovic, I.C.; Ranin, L.; Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 428–432.
19. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179.

20. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Bonaventura, G.; Djukic, S.; Irkovic, I.C.; Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS* 71 (5), 687–690.
21. Swanson, K.M.J.; Petran, R.L.; Hanlin, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. (2001) In: Downes, F.P.; Ito, K. (ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed., American Public Health Association, Washington, p. 53-62.
22. Tiba, M.R.; Nogueira, G.P.; Leite, D.S. (2009). Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42 (1), 58-62.
23. Vesterlund, S.; Paltta, J.; Karp, M.; Ouwehand, A.C. (2005). Measurement of bacterial adhesion in vitro evaluation of different methods. *J. Microbiol. Methods* 60, 225– 233.

Table 1. Microorganisms isolated from surfaces in contact with foods in a poultry slaughterhouse.

Code	Microorganism	Period of isolation	Sampled surface
S1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Polyurethane
S3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Polyethylene
S4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Polyethylene
S6	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Polyethylene
S8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Stainless steel
S9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Stainless steel
S11	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Stainless steel
S13	<i>Staphylococcus aureus</i>	Before washing	Polyethylene
S15	<i>Staphylococcus aureus</i>	After hot water use	Polyurethane
S16	<i>Staphylococcus aureus</i>	After hot water use	Polyurethane
S17	<i>Staphylococcus aureus</i>	After hot water use	Polyethylene
L1	<i>Listeria monocytogenes</i>	Before washing	Stainless steel
L2	<i>Listeria monocytogenes</i>	Before washing	Stainless steel
L3	<i>Listeria welshimeri</i>	Before washing	Polyurethane
L4	<i>Listeria monocytogenes</i>	After hot water use	Polyurethane
L5	<i>Listeria monocytogenes</i>	After hot water use	Polyurethane
L6	<i>Listeria monocytogenes</i>	After hot water use	Polyurethane
C1	<i>Escherichia coli</i>	Before washing	Stainless steel
C2	<i>Escherichia coli</i>	Before washing	Stainless steel
C3	<i>Escherichia coli</i>	Before washing	Stainless steel
C4	<i>Escherichia coli</i>	Before washing	Stainless steel
C6	<i>Escherichia coli</i>	Before washing	Stainless steel
C7	<i>Escherichia coli</i>	After hot water use	Polyurethane
C8	<i>Escherichia coli</i>	After hot water use	Polyethylene
C9	<i>Escherichia coli</i>	After sanitizing agent ¹	Polyurethane
C10	<i>Escherichia coli</i>	After sanitizing agent ¹	Polyethylene

¹: 1% biguanide was used as sanitizing agent in this treatment.

Table 2. Results for biofilm production on microtiter plates for *Staphylococcus aureus*, *Listeria* and *Escherichia coli* in TSB at different glucose concentrations.

Tested media	No biofilm producers			Weak biofilm producers			Moderate biofilm producers			Strong biofilm producers		
	<i>S.a.</i>	<i>L.</i>	<i>E.c</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.</i>	<i>E.c</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.</i>	<i>E.c</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.</i>	<i>E.c</i>
TSB w/o G	4	1	0	8	3	3	0	3	4	0	0	3
TSB + 0.5% G	11	4	0	1	1	2	0	2	8	0	0	0
TSB + 1% G	11	1	1	1	5	2	0	1	7	0	0	0
TSB + 1.5% G	1	3	0	11	4	7	0	0	3	0	0	0
TSB + 2% G	3	2	0	7	1	3	1	4	7	1	0	0
TSB + 2.5% G	5	0	0	7	3	2	0	4	8	0	0	0
TSB + 3% G	8	1	0	3	4	5	0	2	5	1	0	0
TSB + 3.5% G	8	0	2	1	2	1	0	4	6	3	1	1
TSB + 4% G	2	0	4	4	3	0	1	4	5	5	0	1

TSB: - Tryptic Soy Broth without dextrose – Difco; G: glucose.
S.a.: *Staphylococcus aureus*; *L.*: *Listeria*; *E.c.*: *Escherichia coli*

#BJM-68 : Quantification of biofilm production on polystyrene by Li...

•	SUMMARY
•	REVIEW
•	EDITING

Submission

Authors	Laura Beatriz Rodrigues, Luciana Ruschel dos Santos, Vinícius Zancanaro Tagliari, Natalie Nadin Rizzo, Graciela Trenhago, Amauri Picollo de Oliveira, Franciane Goetz, Vladimir Pinheiro do Nascimento
Title	Quantification of biofilm production on polystyrene by <i>Listeria</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from a poultry slaughterhouse
Original file	BJM-68-11232-52811-1-SM.DOC 2009-04-11
Supp. files	None ADD A SUPPLEMENTARY FILE
Submitter	Laura Beatriz Rodrigues 
Date submitted	April 11, 2009 - 12:29 PM
Section	Veterinary Microbiology
Editor	Silvio Vasconcellos 
Author comments	We are sending you the manuscript entitled Quantification of biofilm production on polystyrene by <i>Listeria</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from a poultry slaughterhouse, which we would like you to consider for publication in the Brazilian Journal of Microbiology.

Status

Status	Queued for review
Initiated	2009-04-14
Last modified	2009-04-14

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos para avaliação das condições higiênico-sanitárias em sala de cortes em abatedouros de frangos de corte são escassos no Brasil, o que denota maior relevância a esta pesquisa realizada.

Quando se realizou o primeiro trabalho, para avaliar a contaminação das superfícies em contato com carne de frango durante o processamento, objetivava-se conhecer a frequência dos microrganismos nas superfícies que seriam estudadas. A contaminação por *Escherichia coli* foram baixas, e por *Salmonella* sp. foi ausente. Os microrganismos mesófilos foram os mais recuperados, seguidos dos *Staphylococcus* sp, *S. aureus* e coliformes totais.

Estas amostragens foram realizadas com *swabs*, e deram uma visão inicial do que seria recuperado nas bancada de aço inoxidável, esteira de poliuretano, esteira sobreposta de nylon e placas de polietileno analisadas. Como este experimento foi realizado somente durante o processamento dos cortes, demonstrava que a contaminação se mantinha constante durante o contato do alimento com a superfície, e que existe uma necessidade inerente ao processo para a realização de procedimentos de higiene na sala de cortes.

A comparação entre *swab* e esponja foi realizada devido a uma sugestão para a utilização de um novo produto que estava sendo lançado. Entretanto, havia a necessidade de termos certeza em relação a sua efetividade quando comparado ao uso dos *swabs*, tradicionalmente utilizados e recomendados para coletas em superfícies na microbiologia. Deste modo, o experimento foi realizado, não houve diferença estatística, e as esponjas foram aplicadas para a amostragem na próxima etapa do trabalho.

Na avaliação das condições higiênico-sanitárias da sala de cortes de abatedouros de aves, pesquisando *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e microrganismos mesófilos aeróbios por microbiologia convencional (placas Rodac e esponja), além do uso de ATP-bioluminescência, puderam ser analisados os

diferentes tratamentos que foram utilizados no experimento (antes da limpeza, após o uso da água quente e dos sanitizantes ácido peracético, amônia quaternária e biguanida).

O isolamento de *L. monocytogenes* e *L. welshimeri* na sala de cortes, e a ausência de *Salmonella* sp. em todas as amostras pesquisadas, teve seu contraponto ao relacionar a capacidade de crescimento da *Listeria* em ambiente frios e com alta umidade, como a sala de cortes, por ela ser uma bactéria com características psicotróficas, e pesquisas que demonstram a redução de *Salmonella* durante o processamento da carcaça, fazendo com que a mesma chegue com baixa contaminação para os cortes.

De modo geral, pôde ser observado que a água quente levou a uma redução na carga de matéria orgânica, detectada pelo ATP e, também, de microrganismos, pois houve uma redução de mesófilos, *E. coli* e *S. aureus* após sua aplicação. O uso de sanitizantes também foi de fundamental importância, já que não houve recuperação *S. aureus* após o uso dos três produtos, de *E. coli* após o ácido peracético e a amônia quaternária, e de *Listeria monocytogenes* após o uso de quaternário de amônia.

Os resultados encontrados demonstram que o processo de higienização é importante e complexo, sendo relevante para que seja possível a obtenção de superfícies com baixos níveis de contaminação. Entretanto, na rotina de um abatedouro, não é viável uma higienização freqüente e pré-operacional, utilizando detergentes e sanitizantes, pois o tempo para essa atividade é reduzido, estando normalmente relacionado a trocas de turnos ou a horários para alimentação.

Deste modo, a higiene operacional, realizada através da remoção de resíduos e da utilização de água quente sob pressão, se torna muito importante para a redução de microrganismos, e pode ser possível, como demonstrado com os microrganismos mesófilos e com a os níveis de ATP, neste experimento realizado.

Mesmo assim, a higienização pré-operacional, mesmo não sendo tão freqüente, se faz necessária para uma maior diminuição nos índices de microrganismos e, neste trabalho, o uso de sanitizantes foi imprescindível para a eliminação de patogênicos mas, no caso do uso da biguanida, esta não foi efetiva contra a *E. coli*.

Observa-se que aprimoramentos tem que ser realizados, no sentido de conseguir realizar uma boa higienização no tempo cada vez mais exíguo que existe nos abatedouros avícolas, para que se consiga manter os bons níveis de produtividades com qualidade microbiológica.

Quanto aos métodos avaliados, o ATP-bioluminescência demonstrou a presença de matéria orgânica em todos os pontos coletados, e também evidenciou a eficácia da higienização, demonstrando ser um método rápido para a verificação e controle do processo. Esta agilidade contribui também para que as tomadas de decisão sejam feitas de forma quase imediata, como tudo o que ocorre em um ambiente de abate.

A utilização das placas Rodac possibilitou uma melhor recuperação de microrganismos que a esponja na quantificação de mesófilos aeróbios, *E. coli* e *S. aureus*. É importante que se utilize métodos rápidos, como ATP-bioluminescência, para auxiliar nas decisões emergenciais, mas conciliar a microbiologia convencional é indispensável para que se tenha conhecimento dos microrganismos que fazem parte do ambiente do abatedouro, e se estes estão sendo realmente inativados com o processo de higienização.

Após a recuperação dos microrganismos, foi realizada a quantificação da formação de biofilme em poliestireno pelas *Listeria*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados, avaliando-se a fonte de glicose do meio fornecido para crescimento. Os microrganismos demonstraram-se com capacidade de formar biofilme, sendo que algumas amostras foram fortemente formadoras, com diferentes concentrações de glicose, de acordo com a espécie bacteriana.

Também foi avaliada a formação de biofilme em microplacas de poliestireno em amostras de *Salmonella* Heidelberg que haviam sido isoladas previamente no mesmo abatedouro avícola aonde seria realizado o experimento para a avaliação, e a sua hidrofobicidade. Estas amostras também foram capazes de formar biofilme, com duas amostras fortemente formadoras, e apresentaram hidrofobicidade. A hidrofobicidade é um dos fatores envolvidos na formação de biofilmes, e amostras hidrofóbicas normalmente apresentam maior capacidade de adesão.

O fato de bactérias isoladas de alimentos ou de superfícies em contato com alimentos possuírem a capacidade de formar biofilme é uma informação de grande valia, pois demonstra que a indústria avícola deve se preocupar com os procedimentos de higienização que estão sendo realizados, com quais produtos, em quais concentrações e qual o tempo de ação, para que estes biofilmes, caso sejam formados, possam ser removidos.

Existe a necessidade de continuidade do trabalho, repetindo o experimento em diversos pontos de abatedouros de frangos de corte, já que neste trabalho houve possibilidade de coleta em um único abatedouro. Preferencialmente poderiam ser

realizadas pesquisas em abatedouros diferentes, em momentos diversos, para verificar os resultados em condições e lotes de aves diferentes. Além de pesquisar somente superfícies em contato com alimentos, as superfícies que não estão em contato também poderiam ser avaliadas.

A pesquisa com biofilmes também necessita ser estendida, avaliando a hidrofobicidade dos microrganismos isolados, e a capacidade de formação de biofilme nas superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polietileno.

REFERÊNCIAS

ABEF. **Associação brasileira dos produtores e exportadores de frangos**. Informativo on line. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 10 de março de 2009.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed., Washington: American Public Health Association, p. 357-380, 2001.

ASGAV. **Associação gaúcha de avicultura**. Disponível em: <<http://www.asgav.com.br>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, on-line, São Paulo, v.67, n.1, jan-junho, 2000. Disponível: http://www.biologico.br/arquivos/v.67_1/pesquisa_salmonella . Consultado em 12 de janeiro de 2006. ISSN 0020-3653.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **Institute of Food Technologists**, v. 2, p. 22-32, 2003.

CORBITT, A.J.; N. BENNION; N.; S.J. FORSYTHE. Adenylate kinase amplification of ATP-bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 443-447, 2000.

COSTA, P.D. ; ANDRADE, N.J. ; SOARES, N.F.F.; PASSOS, F.J V.; BRANDÃO, S.C.C. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures

of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 345-349, 2006.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745. 1995.

DELAZARI, I. **Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves**. In: Semana Acadêmica Veterinária, 8., 1998, São Paulo. Anais. São Paulo: 1998. p.71-77.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v.15, n.2, p. 167–193, 2002.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 410 p.

FRAZIER, N.C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 512p.

FURLAN, R.L. Anatomia - Fisiologia. In: BERCHIERI Jr,A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p.13-28.

GHIGO,J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**. v. 412. p. 442-445.

INGRAN, M.; SIMONSEN, B. Poultry and poultry meat products. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microbial ecology of foods: food commodities**. New York: Academic Press, 1990. v.2. p.410-458.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre, 6 ed.: Artmed, 2005. 711 p.

JAY, J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v.7, n.4/5, p.209-214, 1996.

JESSENS, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International biodeterioration & biodegradation**, v.51, p.265-269, 2003.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, Indrani.; 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.

McDONELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Rev.** v. 12, p. 147-179, 1999.

MEAD, G.C. Hygienic problems and control of process contamination. In: Mead, G.C. **Processing of poultry**. New York: Elsevier, 1989. p.360-368.

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva de carne de aves no Brasil. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, E.A; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004. p. 2-17.

MORAES, M.S.V.; ANDRADE, N.J.; CHAVES, J.B.P.; PASSOS, F.J.V.; GOMIDE, L.A.M. Isolament of aerobic mesofilic and thermofilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.17, p.325-329, 1997.

O'GARA, J. P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 270, p. 179-188, 2007.

PARDI, M. C. at al. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 2 ed. Goiânia: Ed. da UFG, 2001. v. 1. 623 p.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: riscos microbiológicos da carne**, Goiânia: UFG, 1995. v.1, p.294-308.

PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 47, n.1, p.77-83, 2004.

PELISSER, M. R. et al . Detecção de *Listeria* spp em carcaças refrigeradas de frangos empregando Clearview e um método convencional de cultura modificado. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 32, n. 2, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>. Acesso em: 19 set 2007.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.116 (3), p.372-383, 2007.

ROSENBERG, M., KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. **Advances Microbiology Ecology**, v. 9, p. 353-393, 1986.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.;ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p. 29-33, 1980.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International journal of food microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.

SALLE, C.T.P.; SILVA A.B. Prevenção de Doenças, Manejo Profilático, Monitoração. In: BERCHIERI Jr,A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: Facta, 2000. p.3-12.

SILVA, N. ; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1995. 228 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVA, W. P. et al . *Listeria spp.* no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>. Acesso em 19 set 2007.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159 p.

SNYDER, P.O. Foodservice HACCP. **Foodservice Research International**. v. 13, p. 227-267, 2003.

WERNER, E.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; PITTS, B.; STEWART, P. S. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 70, p. 6188-6196, 2004.

WIEST, J.M. Desinfecção e desinfetantes. In: GUERREIRO, et al. **Bacteriologia especial: com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984. cap. 5. p. 51-66.