

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

**INFLUÊNCIA DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE NOREPINEFRINA E  
DA ACIDIFICAÇÃO NO CRESCIMENTO E ADESÃO DE *SALMONELLA*  
HEIDELBERG DE ORIGEM AVÍCOLA**

**Dissertação de Mestrado**

**Vivian Lucca**

**PORTO ALEGRE**

**2019**

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

**INFLUÊNCIA DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE NOREPINEFRINA E  
DA ACIDIFICAÇÃO NO CRESCIMENTO E ADESÃO DE *SALMONELLA*  
HEIDELBERG DE ORIGEM AVÍCOLA.**

**Autora: Vivian Lucca**

**Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção de  
grau de Mestre em Ciências  
Veterinária na Área de Sanidade  
Avícola.**

**Orientador: Dr. Vladimir Pinheiro do  
Nascimento**

**Coorientadora: Dra. Anderlise Borsoi**

**PORTO ALEGRE**

**2019**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

#### CIP - Catalogação na Publicação

Lucca, Vivian  
Influência de duas concentrações de norepinefrina e da acidificação no crescimento e adesão de Salmonella Heidelberg de origem avícola. / Vivian Lucca. -- 2019.  
72 f.  
Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Coorientadora: Anderlise Borsoi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Salmonella Heidelberg. 2. Crescimento. 3. Biofilme. 4. Indução ácida. 5. Norepinefrina. I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, orient. II. Borsoi, Anderlise, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Vivian Lucca

**INFLUÊNCIA DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE NOREPINEFRINA E  
DA ACIDIFICAÇÃO NO CRESCIMENTO E ADESÃO DE *SALMONELLA*  
HEIDELBERG DE ORIGEM AVÍCOLA.**

Aprovado em: 22 FEV 2019

APROVADO POR:

---

Prof.º Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maristela Lovato

Membro da Comissão

---

Dra. Karen Apellanis Borges

Membro da Comissão

---

Prof.º Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais, Walter e Liciane, pelo apoio emocional, incentivo e, sobretudo, pela educação que me deram. Por serem meu porto seguro e permitindo que eu escolhesse o meu caminho. Obrigada pela preocupação dada durante o mestrado para que eu pudesse alcançar meus objetivos, sem vocês seria muito difícil de superar os obstáculos que surgiram ao longo desses dois anos. Gratidão e amor eterno.

Ao meu irmão, Matheus, pela paciência e compreensão.

Aos meus amigos, que tornaram a minha vida mais alegre, sempre presentes em todas as conquistas e também nas derrotas.

Ao meu orientador, Prof.º Dr. Vladimir, pelo voto de confiança e pela oportunidade de orientação ao longo desses dois anos.

A minha coorientadora Prof.ª Dra. Anderlise, obrigada pela orientação, pelas reuniões por Skype, pelos ensinamentos dados durante todo este período, mesmo à distância.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação do CDPA: Brunna, Caroline, Daiane W. e Hiran pela descontração e risadas. Um agradecimento especial a Daiane Carvalho pelo apoio e a ajuda em todos os momentos que precisei desde o início até o final do mestrado. À equipe do laboratório: Gabriela, Thales, Karen, Hamilton e Tadeu em que tive o privilégio de conviver durante esses dois anos de pesquisa.

Ao Laboratório Porto Belo, representado pelo Gustavo Fünkler, que gentilmente cedeu as cepas de *Salmonella* Heidelberg para serem estudadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 001) pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigado a todos aqueles citados e mesmo aqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma na minha trajetória.

A todos vocês, meu muito obrigada!

## RESUMO

*Salmonella* spp. é um dos principais patógenos responsáveis por doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. Comunidades bacterianas usam o sistema de *quorum sensing* para controlar a formação de biofilme. O *quorum sensing* caracteriza-se por ser um sistema de comunicação intra e interespecies de microrganismos, baseado na emissão de estímulos e respostas dependentes da densidade populacional. Trata-se de um mecanismo de sinalização célula-a-célula envolvendo a produção, liberação e detecção de compostos semelhantes a hormônios chamados de auto-indutores. A norepinefrina utilizada pelos animais utilizam a mesma sinalização bacteriana dos auto-indutores 3 que servem como um sinal de *quorum sensing*. Situações estressantes como a superlotação, depreciação nutricional e condições inadequadas dos aviários, fazem com que ocorra um aumento do risco de doenças infecciosas, modificando a gravidade da infecção por *Salmonella*. O estresse ácido é um desafio encontrado por microrganismos no ambiente de processamento de alimentos e no trato gastrointestinal dos hospedeiros. Para alcançar o intestino, colonizar e invadir os tecidos, as células patogênicas de *Salmonella* devem sofrer à barreira ácida do estômago, sendo por esta razão, a adaptação ácida uma característica no processo da infecção. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência duas concentrações de norepinefrina (100 µM e 250 µM) e meio acidificado (pH 3,0) no crescimento e na adesão de cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de fontes avícolas a 12°C e 25°C. Além disso, três genes associados ao processo de formação de biofilme foram detectados (*adrA*, *csgD* e *sidA*). Para os ensaios de crescimento e adesão usou-se ensaio de microplaca de poliestireno. A PCR foi utilizada na detecção de genes de virulência associados à produção de biofilme. Dentre os resultados encontrados, com relação a indução ácida, a *Salmonella* Heidelberg teve um menor crescimento em indução ácida, sendo isto esperado pois um bom número delas não consegue sobreviver. Diferente da adesão, em que a indução ácida teve uma maior formação de biofilme em ambas as temperaturas 12°C e 25°C. Houve diferença na adesão quando as bactérias foram tratadas com norepinefrina nas temperaturas 12°C e 25°C para a concentração de 250 µM. Em relação à adesão bacteriana, não se observou influência do estímulo da catecolamina nas cepas de *Salmonella* Heidelberg, independentemente da concentração utilizada, para temperaturas de incubação de 12°C e 25°C. O emprego de meio acidificado resultou em um aumento significativo da adesão das cepas *Salmonella* Heidelberg em ambas as temperaturas testadas. Os genes (*adrA*, *csgD* e *sidA*) para as cepas analisadas, com alta frequência de detecção dos genes *adrA* e *sidA*, sendo superior à frequência do gene *csgD*, presente em 50% das cepas avaliadas. A estimulação de cepas de S. Heidelberg com noradrenalina não resultou aumento do crescimento ou maior adesão bacteriana. No entanto, o meio acidificado favoreceu o processo de formação do biofilme.

Palavras chaves: *Salmonella* Heidelberg, crescimento, biofilme, indução ácida, norepinefrina.

## ABSTRACT

*Salmonella* spp. is one of the leading pathogens responsible for foodborne illness worldwide. Bacterial communities use the quorum sensing system to control biofilm formation. The quorum sensing is characterized by being an intra and interspecies communication system of microorganisms, based on the emission of stimuli and responses dependent on the population density. It is a cell-to-cell signaling mechanism involving the production, release and detection of hormone-like compounds called self-inducers. Norepinephrine used by animals uses the same bacterial signaling of auto-inducers 3 that serve as a quorum sensing signal. Stressful situations such as overcrowding, nutritional depreciation and inadequate poultry conditions lead to an increased risk of infectious diseases, modifying the severity of *Salmonella* infection. Acid stress is a challenge found by microorganisms in the food processing environment and in the gastrointestinal tract of hosts. To reach the intestine, colonize and invade the tissues, the pathogenic cells of *Salmonella* must undergo the acidic barrier of the stomach, being for this reason, the acid adaptation a characteristic in the process of the infection. The objective of this study was to evaluate the influence of two concentrations of norepinephrine (100  $\mu$ M and 250  $\mu$ M) and acidification (pH 3.0) of the medium on the growth and adhesion of *Salmonella* Heidelberg strains isolated from poultry sources at 12°C and 25°C. Furthermore, three genes associated with the biofilm formation process were detected (*adrA*, *csgD*, and *sidA*). For growth and adhesion assays, a polystyrene microplate assay was used. PCR was used in the detection of virulence genes associated with biofilm production. Among the results found, with respect to acid induction, *Salmonella* Heidelberg had a lower growth in acid induction, this being expected since a good number of them can not survive. Different from adhesion, in which the acid induction had a higher biofilm formation at both temperatures 12°C and 25°C. There was a difference in adhesion when the bacteria were treated with norepinephrine at temperatures 12°C and 25°C for the concentration of 250  $\mu$ M. Regarding bacterial adhesion, there was no influence of the catecholamine stimulus on *Salmonella* Heidelberg strains, regardless of the concentration used, for incubation temperatures of 12°C and 25°C. The use of acidified medium resulted in a significant increase in the adhesion of *Salmonella* Heidelberg strains at both temperatures tested. The genes (*adrA*, *csgD* and *sidA*) for the strains analyzed, with a high detection frequency of the *adrA* and *sidA* genes, were higher than the frequency of the *csgD* gene present in 50% of the strains evaluated. Stimulation of *S. Heidelberg* and noradrenaline strains did not result in increased growth or increased bacterial adhesion. However, the acidified medium favored the process of biofilm formation.

**Keywords:** *Salmonella* Heidelberg, growth, biofilm, acid induction, norepinephrine.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 -</b>	Genes, sequências de <i>primers</i> utilizadas, tamanho dos <i>amplicons</i> (pb) e trabalhos de referência para obtenção das sequências dos <i>primers</i> .....	27
<b>TABELA 2 -</b>	Pesquisa de genes associados à formação de biofilme através da técnica de PCR: concentrações dos reagentes do <i>mix</i> , condições e número de ciclos do termociclador .....	28
<b>TABELA 3 -</b>	Médias e desvios-padrão da densidade óptica para avaliação do crescimento de <i>Salmonella</i> Heidelberg a 12°C e a 25°C submetidas a diferentes tratamentos .....	30
<b>TABELA 4 -</b>	Médias e desvios-padrão da densidade óptica para avaliação da adesão bacteriana por cepas de <i>Salmonella</i> Heidelberg a 12°C e a 25°C submetidas a diferentes tratamentos .....	31
<b>TABELA 5 -</b>	Frequências absolutas e relativas das cepas produtoras de biofilmes a 12°C e a 25°C submetidos a diferentes tratamentos (n=20) .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≤	Menor igual
≥	Maior igual
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de cepas tipo americana)
AI	Auto-indutores
AR	Resistência ácida independente de Ph
ATR	Resposta à tolerância a ácidos indutível por baixo Ph
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleotídios trifosfato
DTA	Doenças transmissível por alimentos
EPS	Substância Polimérica Extracelular
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro
OD	Densidade Óptica
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomolar
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RS	Rio Grande do Sul
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
Seg	Segundo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1	<i>Salmonella</i> spp. ....	13
2.2	Infecção nas aves .....	13
2.3	Importância de <i>Salmonella</i> em saúde pública .....	14
2.4	<i>Salmonella</i> Heidelberg .....	15
2.5	Estresse em aves .....	16
2.5.1	Relação entre o estresse em aves e a infecção por patógenos .....	16
2.5.2	Catecolaminas .....	16
2.6	Estresse ácido .....	17
2.7	<i>Quorum sensing</i> .....	18
2.8	Biofilmes .....	19
2.9	Genes associados à formação de biofilme .....	21
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1	Local de execução .....	22
3.2	Isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg .....	22
3.3	Reativação das cepas de <i>Salmonella</i> .....	22
3.4	<b>Experimento 1 – Avaliação do crescimento bacteriano após estímulo com catecolamina e com meio acidificado</b> .....	23
3.4.1	Preparo do inóculo .....	23
3.4.2	Preparo da solução estoque de norepinefrina (NOR) .....	23
3.4.3	Preparo do caldo RPMI acidificado .....	23
3.4.4	Avaliação do crescimento bacteriano .....	24
3.5	<b>Experimento 2 – Avaliação da adesão bacteriana e da capacidade de formação de biofilme após estímulo com catecolamina e com meio acidificado</b> .....	24
3.5.1	Preparo do inóculo .....	24
3.5.2	Preparo da solução estoque de norepinefrina (NOR) .....	25
3.5.3	Preparo do caldo TSB acidificado .....	25
3.5.4	Avaliação da adesão bacteriana .....	25
3.5.5	Avaliação da formação de biofilme .....	26

3.6	Experimento 3 – Pesquisa de genes associados à formação de biofilmes .....	26
3.7	Análise estatística .....	28
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	30
4.1	Avaliação do crescimento bacteriano após estímulo com catecolaminas e com meio acidificado .....	30
4.2	Avaliação da adesão bacteriana e da capacidade de formação de biofilme após estímulo com catecolaminas e com meio ácido .....	31
4.3	Pesquisa de genes associados à formação de biofilme .....	32
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	33
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
	REFERÊNCIAS .....	41
	APÊNDICE A – Isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg: identificação, ano, fonte de isolamento e perfil de genes associados à formação de biofilme ....	51
	ARTIGO .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura tem alcançado uma melhor eficiência produtiva devido aos custos mais baixos e à facilidade em produzir aves para o abate em um curto espaço de tempo. Esta melhora está relacionada à seleção genética, à nutrição, à sanidade e às inovações nas metodologias de manejo, ambiência, tecnologias de processamento e de comercialização. A avicultura emprega direta e indiretamente mais de 3,6 milhões de pessoas gerando 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (ABPA, 2015). Em 2017, o Brasil produziu 13,056 milhões de toneladas de carne de frango e exportou mais de 4,320 milhões de toneladas, colocando o país como o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango. Os três estados da região sul do Brasil foram responsáveis por aproximadamente 64,35% da exportação brasileira de carne de frango em 2017, sendo o Rio Grande do Sul (RS) responsável por 13,82%. O consumo *per capita* no Brasil em 2017 foi de 42,07Kg/habitante/ano (ABPA, 2018).

Com a expansão da avicultura houve uma maior concentração de aves por metro quadrado, favorecendo a multiplicação e a instalação de agentes patogênicos. Dentre os agentes patogênicos, destaca-se o gênero *Salmonella*, que causa uma enfermidade de grande impacto econômico (BELUSSO; HESPANHOL, 2010). *Salmonella* spp. é um dos principais microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. Infecções por *Salmonella* frequentemente causam gastroenterite que pode variar de leve a grave (CDC, 2011). Os produtos de origem avícola são as principais fontes de salmoneloses em humanos (SHINOHARA *et al.*, 2008). O sorovar *Salmonella* Heidelberg é citado como o terceiro mais frequentemente isolado na avicultura no Canadá, e o quarto mais associado com doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos (CHITTICK *et al.*, 2006). No Brasil, desde 1962 este sorovar tem sido identificado em aves e em produtos derivados (HOFER *et al.*, 1997). Dentre os sorovares pertencentes ao gênero *Salmonella* que causam infecção em humanos, o sorovar *S. Heidelberg* parece ser mais invasivo e causar doenças com maior gravidade que outros sorovares paratíficos (PUBLIC, 2007).

*Quorum sensing* é a sinalização entre as bactérias e ocorre através da produção de substâncias denominadas de auto-indutores (AI), sendo o AI-3 responsável por ativar a expressão gênica em *Salmonella*. As catecolaminas

produzidas pelos eucariotos em situações de estresse utilizam a mesma via de sinalização do AI-3 (SPERANDIO *et al.*, 2003). Desta forma, o aumento de excreção de patógenos importantes, como *Salmonella*, tem sido relacionado com o estresse associado ao intenso processo de criação das aves (STEVENS, 2010), uma vez que a liberação das catecolaminas pode interferir na microbiota intestinal através da sinalização de bactérias do trato gastrointestinal (LYTE *et al.*, 2011). Estudos demonstram que o *quorum sensing* regula uma série de fenótipos bacterianos, incluindo a formação de biofilme e a expressão de genes de virulência (SOLA *et al.*, 2012).

O estresse ácido é um desafio encontrado por microrganismos no ambiente de processamento de alimentos e no trato gastrointestinal das aves. Para alcançar o intestino, colonizar e invadir os tecidos, as células patogênicas de *Salmonella* devem sobreviver à barreira ácida do estômago. Por esta razão, a adaptação ácida é uma característica importante no processo da infecção (GRAVANI, 1992). A habilidade de tolerar o pH baixo pode ter implicações na virulência do patógeno (FERREIRA, 2007). Respostas de tolerância ao estresse são comumente mediadas através da ativação de reguladores de resposta que controlam a expressão de conjuntos específicos de genes e orquestram respostas muito complexas envolvendo a indução de enzimas celulares, a síntese de proteínas do choque de estresse que protegem ou repararam o DNA, e modulação da composição e das propriedades físicas dos envelopes celulares. Uma vez que o estressor desaparece, a população bacteriana recupera sua tolerância convencional ao agente de estresse particular (ALVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência das catecolaminas e de meio acidificado no crescimento e na adesão bacteriana de cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de fontes avícolas. Também foram pesquisados genes envolvidos no processo de formação de biofilmes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Salmonella* spp.

Bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos mesófilos, Gram-negativos, não formadores de esporos e móveis (exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*), com flagelos peritríquios. São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, produzem gás sulfídrico e ácido a partir da glicose (OIE, 2012). A temperatura ideal de crescimento é de 35°C a 37°C, porém é possível verificar o seu crescimento entre 7°C e 48°C. São sensíveis à exposição dos raios solares e à maioria dos desinfetantes como fenóis, clorados e iodados. A bactéria é destruída por irradiação, sendo que a presença de oxigênio aumenta o efeito letal da irradiação (BOROWSKY *et al.*, 2006). Apresenta crescimento em pH entre 6,5 e 7,5 podendo tolerar condições de pH entre 4,5 e 9,0 (TORTORA *et al.*, 2003). O gênero *Salmonella* é resistente à dessecação e ao congelamento, podendo sobreviver no meio ambiente por vários anos. Os antígenos da camada de lipopolissacarídeos (LPS) facilitam o contato direto da bactéria com o ambiente, contribuindo na interação do agente com o hospedeiro e permitindo com que *Salmonella* spp. possa resistir a diferentes locais e condições, como fezes, poeira, ambientes secos, acidez do estômago, lúmen do intestino, espaço extracelular dos tecidos do hospedeiro e dentro de macrófagos (SUO *et al.*, 2010).

Este gênero consiste em apenas duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* apresenta seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizone*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Segundo o esquema de Kauffman-White, atualmente já foram identificados mais de 2500 sorovares de *Salmonella*, dividindo este gênero em sorotipos com base na composição de seus antígenos de superfície somáticos (O), flagelares (H), e capsulares (Vi) (TRABULSI; ALTERTHUM; 2008).

### 2.2 Infecção nas aves

*Salmonella* pode causar três doenças nas aves: Pulorose, Tifo e Paratifo Aviário. A Pulorose é causada por *S. Pullorum* e acomete aves mais jovens, levando

ao espessamento da parede intestinal, à presença de nódulos amarelados na parede do duodeno, e cecos com conteúdo caseoso. A transmissão ocorre de forma horizontal ou vertical, pelas vias transovariana e extragenital. O Tifo é causado por *S. Gallinarum* sendo mais comum em aves adultas. Na necropsia observa-se uma coloração marrom-esverdeada do fígado. A transmissão ocorre principalmente pela via horizontal. As infecções paratíficas são causadas por sorovares não específicos das aves, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, mas que podem determinar a doença em humanos. Nas aves, pode ocorrer uma enterite crônica severa acompanhada de lesões necróticas focais e espessamento de parede dos cecos com conteúdo caseoso ou liquefeito. Os sorovares causadores do Paratifo podem permanecer no trato digestivo das aves até o abate, onde pode ocorrer a contaminação do produto final (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). O ovo também pode ser contaminado pela cloaca através da penetração da bactéria pela casca (MUNIZ, 2012).

As aves contaminam-se por via oral quando a bactéria está presente no ambiente (cama, ração e nas granjas). Após a ingestão, o microrganismo se localiza no papo e no intestino (BACK *et al.*, 2006). A maioria das salmonelas paratíficas instala-se na parede intestinal, principalmente dos cecos, onde se multiplicam e são eliminadas pelas fezes de forma constante ou intermitente. As salmonelas específicas das aves são mais invasivas, causando infecções septicêmicas e contaminando vários órgãos. A modulação da microbiota intestinal das aves no início da vida é de vital importância no processo de controle do agente (FACTA, 2016). A habilidade de *Salmonella* em resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, como o baixo pH estomacal, o aumento da temperatura, a baixa tensão de oxigênio, a alta osmolaridade, a ação da bile, o peristaltismo, as lisozimas, as lactoferrinas e a microbiota local, baseia-se na sua capacidade de modular a expressão dos genes de virulência em resposta a estas condições (OCHO; RODRÍGUEZ, 2005).

### **2.3 Importância de *Salmonella* em saúde pública**

*Salmonella* spp. está entre os principais agentes envolvidos nas toxinfecções transmitidas por alimentos, sendo frequentemente isolada em alimentos de origem avícola e suínica. A salmonelose representa risco à segurança alimentar no

âmbito mundial e é uma das principais doenças transmitidas por alimentos (DTA) em todo o mundo, inclusive no Brasil (ROSA *et al.*, 2015, WHO, 2018).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) estima que *Salmonella* acometa cerca de 1,2 milhão de pessoas, ocasionando 23.000 hospitalizações e 450 mortes nos Estados Unidos a cada ano (CDC, 2018). Na União Europeia, *Salmonella* é a segunda principal causa de DTA, ficando atrás apenas de *Campylobacter* (EFSA, 2017). Infecções por *Salmonella* spp. correspondem a mais de 30% de todos os casos de DTA no Brasil entre 2000 e 2017 (BRASIL, 2018).

#### **2.4 *Salmonella* Heidelberg**

*Salmonella* Heidelberg é um sorotipo pertencente à subespécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* e ao sorogrupo B, sendo considerada altamente prevalente no Canadá e nos Estados Unidos, mas raramente relatada em países europeus (CURY, 2013). Este sorovar parece ser mais invasivo e causar doenças com maior gravidade que outros sorovares paratíficos (PUBLIC, 2007).

Para Menconi *et al.* (2011), esse sorotipo está entre os três mais frequentemente isolados de pessoas com toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* na América do Norte, sendo este índice maior que em outras regiões do mundo. Nos Estados Unidos, *S. Heidelberg* é o quarto sorovar mais comumente reportado em doenças em humanos (CHITTICK *et al.*, 2006), sendo que estas toxinfecções em seres humanos, podem ser causadas pelo consumo de ovos e de produtos cárneos provenientes de aves infectadas (CURY, 2013).

No Brasil, *S. Heidelberg* era o 9º sorotipo com maior prevalência até 2011, sendo mais frequentemente isolado nas regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul (BORSOI *et al.*, 2011). A frequência de isolamento do sorovar *S. Heidelberg*, a partir de fontes avícolas, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (ANDREATTI, 2014).

Sobre as alterações causadas por *S. Heidelberg* na mucosa intestinal, cabe ressaltar que são semelhantes àquelas causadas por *S. Enteritidis*. Entretanto, as aves desafiadas com *S. Enteritidis* excretaram maior quantidade de bactérias que as aves desafiadas com *S. Heidelberg* (BORSOI *et al.*, 2011).

## 2.5 Estresse em aves

### 2.5.1 Relação entre o estresse em aves e a infecção por patógenos

Quando há percepção de estresse, o Sistema Nervoso Central (SNC) libera uma variedade de hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos que podem afetar diretamente as funções imunes, geralmente resultando em seu declínio (BORSOI *et al.*, 2015). A liberação de hormônios, como as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), pode interferir na microbiota intestinal através da sinalização de bactérias patogênicas para que iniciem o crescimento e a produção de fatores de virulência como parte do processo de doenças infecciosas (LYTE *et al.*, 2011). Em animais de produção, como aves e suínos, as infecções por patógenos como *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* são exemplos de bactérias de importância em saúde pública que em animais sob estresse podem superar a microflora comensal, infectar e persistir no hospedeiro devido a um aumento do potencial de virulência do microrganismo. A produção avícola tem o desafio de reduzir a prevalência de *Salmonella* nos planteis. Situações estressantes para as aves, tais como superlotação, depreciação nutricional, condições inadequadas dos aviários e temperatura ambiente muito elevada, aumentam o risco de doenças infecciosas, modificando a gravidade da infecção por *Salmonella* (BORSOI *et al.*, 2015).

### 2.5.2 Catecolaminas

As catecolaminas são formadas por um grupo catecol ligado a um grupo amina. Elas são solúveis em água e 50% destas substâncias circulam na corrente sanguínea ligadas a proteínas plasmáticas. As catecolaminas são sintetizadas no cérebro, na medula adrenal e por algumas fibras nervosas simpáticas a partir do aminoácido L-tirosina, de acordo com a seguinte sequência: tirosina → dopa (dihidroxifenilalanina) → dopamina → norepinefrina (noradrenalina) → epinefrina (adrenalina). Em circunstâncias normais, a epinefrina é secretada em maior quantidade do que a norepinefrina, a partir da medula adrenal. Em contrapartida, a norepinefrina é liberada em maior quantidade a partir do sistema nervoso simpático (MORENO, 2017).

Em termos fisiológicos, uma das importantes ações destes hormônios é iniciar uma reação generalizada de luta, conflito, discussão ou uma fuga rápida. Esta resposta, que pode ser desencadeada por uma queda da pressão arterial ou pela dor, lesão física ou emocional, perturbação abrupta ou hipoglicemia, é caracterizada por um aumento da frequência cardíaca, ansiedade, aumento da transpiração, tremores e aumento das concentrações de glicose no sangue. Estas ações das catecolaminas ocorrem em conjunto com outras respostas neuronais e hormonais a situações de estresse, tais como aumentos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e secreção do cortisol (MORENO, 2017).

## 2.6 Estresse ácido

A capacidade de bactérias patogênicas de resistirem a condições ambientais adversas tem sido identificada como um determinante presuntivo de seu potencial de virulência através da avaliação das respostas de tolerância ao estresse de patógenos bacterianos transmitidos por alimentos (ALVAREZ–ORDÓÑEZ *et al.*, 2015). O estresse ácido é um desafio comumente enfrentado por microrganismos no ambiente de processamento de alimentos e no trato gastrointestinal do hospedeiro. Para alcançar o intestino e colonizar e invadir os tecidos intestinais, as células patogênicas de *Salmonella* devem sobreviver à barreira ácida do estômago. Por esta razão, a adaptação ácida é uma característica importante para o sucesso da infecção (GRAVANI, 1992). O pH ácido do estômago é reconhecido como a primeira linha de defesa contra patógenos transmitidos por alimentos, e a resistência ácida de patógenos pode contribuir para sua virulência (BERK *et al.*, 2005). As respostas das enterobactérias frente a este desafio têm sido extensivamente estudadas através de diferentes técnicas. Atualmente já foram descritos dois sistemas de resistência ácida para *S. enterica*: (1) resistência ácida independente de pH (AR), que é expressa após a entrada do patógeno em fase estacionária como parte de uma resposta generalizada ao estresse; (2) resposta à tolerância a ácidos indutível por baixo pH (ATR), manifestada nas fases log e estacionária, conferindo proteção ao patógeno contra a exposição subsequente às condições ácidas letais (pH <4.0) (LIANOU *et al.*, 2017). As células em fase log estão se adaptando às novas condições para iniciar a divisão celular e, por isso, são mais alongadas do que as células em fase estacionária. As células em fase estacionária desencadeiam respostas adaptativas às limitações de nutrientes, como a redução do tamanho

celular, mudanças das propriedades da superfície celular (relacionadas à hidrofobicidade e à adesão), da atividade metabólica e resistência a estresses ambientais (WHITE, 2007). A indução de mecanismos de resistência ácida sob condições de estresse ácido subletal resulta em alterações nas características de virulência de patógenos veiculados por alimentos e se constitui uma preocupação importante entre microbiologistas de alimentos, processadores de alimentos e legisladores (THERON; LUES, 2007; PEREZ *et al.*, 2011; MAKARITI *et al.*, 2015).

## 2.7 *Quorum sensing*

O *quorum sensing* (QS) caracteriza-se por ser um sistema de comunicação intra e interespecies de microrganismos, baseado na emissão de estímulos e respostas dependentes da densidade populacional. Este tipo de interação reflete o comportamento dos microrganismos, demonstrando a capacidade de habitar ambientes diversos, captar as informações de seu meio, comunicar-se com diferentes espécies, monitorar sua densidade populacional e, principalmente, regular a sua expressão gênica, controlando processos celulares como a esporulação, a formação de biofilmes, a expressão de fatores de virulência, a produção de bactericidas e antibióticos e a bioluminescência (SOLA *et al.*, 2012). Trata-se de um mecanismo de sinalização célula-a-célula envolvendo a produção, liberação e detecção de compostos semelhantes a hormônios chamados de auto-indutores (AI) (SPERANDIO *et al.*, 2001). A detecção dos auto-indutores liberados em uma população bacteriana permite que as bactérias executem coletivamente comportamentos específicos. Nas bactérias Gram-negativas, os auto-indutores são frequentemente produzidos a partir de *S*-adenosilmetionina (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

Segundo Sola *et al.* (2012), as moléculas sinalizadoras envolvidas no mecanismo de QS podem ser agrupadas em quatro tipos:

- (1) Autoindutor 1 (AI-1): são moléculas derivadas de ácidos graxos que possuem estrutura de N-acil homoserinas lactonas (AHLs). São utilizadas por bactérias Gram negativas no mecanismo de comunicação intraespecies.
- (2) Autoindutor 2 (AI-2): utilizado por bactérias Gram positivas e Gram negativas para comunicação intra e interespecie. É produzido pelo diéster borato de furanosilo.

- (3) Autoindutor 3 (AI-3): é produzido somente por bactérias entéricas.
- (4) Aminoácidos e pequenos peptídeos utilizados por bactérias Gram positivas na comunicação intraespécies.

O AI-3 é inibido pelos antagonistas dos receptores adrenérgicos. Além disto, já foi demonstrado que as catecolaminas induzem a mesma expressão gênica de virulência em *Escherichia coli* entero-hemorrágica. Desta forma, sugere-se que o AI-3 possua uma estrutura similar às catecolaminas. Ou seja, a presença de epinefrina/norepinefrina também pode servir como um sinal de QS (SPERANDIO *et al.*, 2003).

Os moduladores sintéticos de detecção de *quorum* são moléculas que agonizam ou antagonizam o QS e estão sendo desenvolvidos como medicamentos anti-virulência. Diferentemente dos antimicrobianos tradicionais, os moduladores do QS não afetam o crescimento de bactérias patogênicas, mas interrompem seus programas de virulência (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

## 2.8 Biofilmes

Biofilmes são definidos como uma comunidade microbiana sésil formada por células que estão aderidas entre si e a um substrato inerte ou vivo e estão embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (DONLAN; COSTERTON, 2002). Os principais componentes da matriz extracelular são a *curli* e a celulose. A fímbria *curli* está relacionada com a adesão às superfícies, com a agregação celular e com a produção de biofilmes (RÖMLING, 2005). A produção de celulose está associada à adesão em superfícies abióticas e ao aumento da resistência, além de conferir à bactéria a capacidade de interação célula-célula (RÖMLING *et al.*, 2000; RÖMLING, 2007).

A formação do biofilme começa com a adesão inicial das bactérias planctônicas, de vida livre, a uma superfície biótica ou abiótica que contenha substrato necessário para o desenvolvimento bacteriano. Esta primeira adesão é reversível e é mantida por interações físico-químicas não específicas, constituindo o alicerce para o crescimento bacteriano (estágio I). A fase de adesão consiste na maturação do estágio reversível para o irreversível. As bactérias passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Nesta fase há o início da formação de micro colônias na matriz de EPS e do desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro (estágio II). Os

biofilmes maduros apresentam estrutura semelhante a cogumelos, que são envoltos por diversas substâncias, principalmente açúcares, e rodeados por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do biofilme (estágios III e IV). A última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais favorável a sua manutenção, e consiste no destacamento do biofilme maduro em forma de agregados celulares ou células planctônicas. Depois de desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de um novo biofilme (estágio V) (BOARI *et al.*, 2009; HIGA, 2018).

O processo de formação de biofilme depende da interação entre as células bacterianas e a superfície de adesão e das condições do ambiente onde a bactéria se encontra (VAN HOUDT & MICHIELS, 2010; CAMPOCCIA *et al.*, 2013; CAPPITELLI *et al.*, 2014; WHITEHEAD & VERRAN, 2015). Fatores como o pH, temperatura, osmolaridade, níveis de oxigênio, composição de nutrientes e presença de outras bactérias influenciam a formação do biofilme e o padrão de comportamento da bactéria no desenvolvimento destas estruturas (GIAOURIS *et al.*, 2012).

Os biofilmes favorecem a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis, como em abatedouros e em indústrias processadoras de alimentos. A formação destas estruturas nestes ambientes cria fontes persistentes de contaminação do produto, levando a sérios problemas de higiene e também, a perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos (BROOKS; FLINT, 2008). Além disto, são considerados um grande problema em saúde pública, pois a ruptura destas estruturas pode provocar a liberação de microrganismos patogênicos e, conseqüentemente, a contaminação dos produtos (COSTERTON *et al.*, 1995; HUNG & HENDERSON, 2009).

A formação de biofilme aumenta a capacidade de bactérias patogênicas, como *Salmonella*, de sobreviver a fatores de estresses que são comumente encontrados na indústria processadora de alimentos e/ou durante a infecção do hospedeiro (GIAOURIS *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que *Salmonella* pode facilmente se aderir e formar biofilmes em várias superfícies de contato com alimentos, como aço inoxidável, plástico e borracha (GIAOURIS *et al.*, 2012). As bactérias presentes nestas estruturas tendem a exibir um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e à transcrição de genes (DONLAN; COSTERTON, 2002).

## 2.9 Genes associados à formação de biofilme

*Curli* e celulose são os dois principais componentes da matriz extracelular de um biofilme (RÖMLING, 2005). A fímbria *curli*, codificada por *csgBAC-csgDEFG*, é importante nos processos de colonização, persistência, motilidade e invasão da célula hospedeira (BARNHART; CHAPMAN, 2006). A produção das fímbrias é regulada pelo gene *csgD* (anteriormente conhecido como *agfD*), que também atua indiretamente no gene *adrA*, a fim de regular a produção de celulose (RÖMLING, 2002; ZAKIKHANY *et al.*, 2010; MILAN; TIMM, 2015). O efeito do gene *csgD* na produção de celulose ocorre através da ativação da transcrição de *adrA*, a qual gera um ativador alostérico da síntese de celulose (ZOGAJ *et al.*, 2001). A expressão de *curli* e de celulose depende da proteína CsgD, um regulador transcricional da superfamília *luxR*, que ativa a transcrição dos operons *csgBAC* e *csgDEFG* (RÖMLING *et al.*, 2000). O gene *csgD* é considerado um regulador chave que modula a expressão de um conjunto de genes envolvidos na adaptação celular fisiológica para a manutenção do biofilme (GERSTEL *et al.*, 2003; MILAN; TIMM, 2015).

As moléculas de sinal de acil homoserina lactona (AHL) acumulam-se no ambiente extracelular, e uma vez atingido um limiar crítico, a transcrição gênica é afetada pela família *luxR* (HALATSI *et al.*, 2006). A proteína SidiA de *Salmonella* detecta e responde a sinais gerados apenas por outras espécies microbianas (HALATSI *et al.*, 2006). Outro regulador muito importante da patogenicidade e da virulência de *Salmonella* é a capacidade de detecção do QS (SCHMIDT; HENSEL, 2004). O mecanismo exato ainda não está esclarecido, pois o gene *sdiA* é o primeiro exemplo de um receptor bacteriano que detecta exclusivamente os sinais AHLs de outras espécies microbianas (HALATSI *et al.*, 2006).

A expressão dos genes envolvidos é necessária para a formação e maturação do biofilme, podendo ser considerada um ponto de controle na sua produção. Este controle ocorre em *Salmonella* através da regulação da produção dos constituintes principais da matriz extracelular e do controle da transição entre células planctônicas e células com comportamento multicelulares diferenciados (GERSTEL; RÖMLING, 2001).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de execução**

O experimento foi realizado no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado em Porto Alegre, RS.

#### **3.2 Isolados de *Salmonella* Heidelberg**

Foram utilizadas 20 cepas de *Salmonella* Heidelberg (SH) isoladas de fontes avícolas. Os isolados pertencem à bacterioteca do CDPA e estavam conservados a -20°C em caldo cérebro-coração (*Brain Heart Infusion Broth* - BHI, Oxoid; Basingstoke, Reino Unido) suplementado com glicerol na proporção de 3:1. Uma caracterização antigênica completa e identificação sorovar foram realizadas pelo Laboratório de Patógenos Entéricos da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) e Laboratório Porto Belo (Porto Alegre, Brasil). A descrição dos isolados quanto ao ano e à fonte de isolamento variam conforme descrito no APÊNDICE A.

#### **3.3 Reativação das cepas de *Salmonella***

As cepas foram reativadas em caldo BHI (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido) e incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação, 100 µL do caldo BHI foram transferidos para 10 mL de caldo Rapaport-Vassiliadis (RV – Difco; Le Pont Claix, França) e incubados a 42°C por 24h. O material foi semeado em ágar Verde Brilhante (BGA - Difco, Le Pont Claix, França) e incubado a 37°C por 24h. A partir do crescimento em ágar BGA, foi selecionada uma colônia compatível com *Salmonella* para a realização de testes bioquímicos preliminares, conforme a metodologia descrita na Portaria número 126, de 03 de novembro de 1995 do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 1995). Após a confirmação nos testes bioquímicos, foi preparado um novo estoque da cepa. Uma colônia foi repicada em caldo BHI, seguido de incubação em estufa a 37°C por 24h. Após, foi

feita a semeadura em ágar nutriente não seletivo (Himedia; Índia), seguida de incubação em estufa a 37°C por 24h. O material foi estocado sob refrigeração.

### **3.4 Experimento 1 - Avaliação do crescimento bacteriano após estímulo com catecolamina e com meio acidificado**

#### 3.4.1 Preparo do inóculo

As cepas estocadas foram reativadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24h. Após, foi feita a semeadura em ágar desoxicolato-lisina-xilose (*Xylose Lysine Deoxycholate* – XLD – Oxoid; Cambridge, Reino Unido) seguida de incubação a 37°C por 24h. Três colônias características foram selecionadas para inoculação em caldo BHI e posterior incubação a 37°C por 3h para atingir uma concentração aproximada de  $10^6$  UFC/mL (HILLER, 2017). A partir deste inóculo foi feita uma diluição seriada até  $10^2$  UFC/mL. Após, 1 mL da concentração final do inóculo foi separada para o preparo dos tratamentos.

#### 3.4.2 Preparo da solução estoque de norepinefrina (NOR)

Para o teste de avaliação do crescimento bacteriano, utilizou-se norepinefrina ((±)-Norepinephrine (+)-bitartrate, salt, A0937-Sigma-Aldrich; St. Louis, Estados Unidos) em duas concentrações: 100 µM e 250 µM. Inicialmente foi preparada uma solução estoque a uma concentração de 5mM (FREESTONE *et al.*, 1999). A reconstituição foi feita com água destilada estéril, e a esterilização foi realizada com filtro de 0,22µm (K18-230 – Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil). A partir desta solução, foram obtidas as concentrações do trabalho.

#### 3.4.3 Preparo do caldo RPMI acidificado

Para obtenção do caldo RPMI acidificado, o meio foi preparado conforme recomendações do fabricante, seguido da adição de 2 mL de ácido clorídrico (HCl). Desta forma, o pH do caldo RPMI foi reduzido de 7 para 3 (LIANOU *et al.*, 2017), conforme aferição em pHmetro (PHTEK; Brasil). A esterilização do caldo foi realizada com filtro de 0,22µm (K18-230, Kasvi, Brasil).

#### 3.4.4 Avaliação do crescimento bacteriano

A avaliação do crescimento bacteriano foi feita em caldo RPMI (Sigma-Aldrich; Alemanha) em quatro tratamentos: (1) caldo RPMI; (2) caldo RPMI + norepinefrina (100  $\mu$ M); (3) caldo RPMI + norepinefrina (250  $\mu$ M); (4) caldo RPMI acidificado. Para a realização dos testes, foi adicionado o inóculo a cada um dos tratamentos e foi feita a incubação a 37°C por 16h, exceto para o tratamento 4, no qual o período de incubação foi de 4h (LIANOU *et al.*, 2017). Cada tratamento foi testado em duas temperaturas: 12°C $\pm$ 1°C e 25°C $\pm$ 1°C.

Foram inoculados 200 $\mu$ L do inóculo tratado e incubado, em triplicata, em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (K12-096-Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil). Como controle positivo foi utilizado uma cepa de *Salmonella* Enteritidis pertencente à bacterioteca do CDPA, e como controle negativo utilizou-se o caldo RPMI estéril. Foi realizada a leitura da densidade óptica (OD) no leitor de ELISA (ELX800-Biotek; Winooski, Estados Unidos).

### **3.5 Experimento 2 - Avaliação da adesão bacteriana e da capacidade de formação de biofilme após estímulo com catecolamina e com meio acidificado**

#### 3.5.1 Preparo do inóculo

As cepas estocadas foram reativadas em 3 mL de BHI e incubadas a 37°C por 24h. Após, foram semeadas em ágar tripticase de soja sem glicose (*Trypticase Soy Agar – TSA – Oxoid*; Basingstoke, Reino Unido) e incubados a 37°C por 24h. A partir do TSA, as cepas foram inoculadas em 3 mL de caldo tripticase de soja sem glicose (TSB – Becton, Dickinson e Company -BD, Franklin Lakes, Estados Unidos) e incubadas a 37°C por 24h. Após, foi feita a diluição do caldo TSB cultivado em caldo TSB não inoculado até se obter a concentração correspondente a 1 na escala nefelométrica de Mc Farland. Foi feita a leitura em espectrofotômetro (SP-22-Biospectro; Curitiba, Brasil) e obteve-se leituras em um intervalo de 0,224 a 0,300 no comprimento de onda de 620 nm.

### 3.5.2 Preparo da solução estoque de norepinefrina

Para o teste de avaliação da adesão bacteriana, utilizou-se norepinefrina ((±)-Norepinephrine (+)-bitartrate, salt, A0937, Sigma-Aldrich; St. Louis, Estados Unidos) em duas concentrações: 100 µM e 250 µM. Inicialmente foi preparada uma solução estoque a uma concentração de 5mM (FREESTONE *et al.*, 1999). A reconstituição foi feita com água destilada estéril, e a esterilização foi realizada com filtro de 0,22µm (K18-230 - Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil). A partir desta solução, foram obtidas as concentrações do trabalho.

### 3.5.3 Preparo do caldo TSB acidificado

Para obtenção do caldo TSB acidificado, o meio foi preparado conforme recomendações do fabricante, seguido da adição de 1 mL de ácido clorídrico (HCl). Desta forma, o pH do caldo TSB foi reduzido de 7 para 3 (LIANOU *et al.*, 2017), conforme aferição em pHmetro (PHTEK; Brasil). A esterilização do caldo foi realizada com filtro de 0,22 µm (K18-230 – Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil).

### 3.5.4 Avaliação da adesão bacteriana

A avaliação da adesão bacteriana foi em caldo TSB em quatro tratamentos: (1) caldo TSB; (2) caldo TSB + norepinefrina (100 µM); (3) caldo TSB + norepinefrina (250 µM); (4) caldo TSB acidificado. Para o preparo do inóculo a cada um dos tratamentos foi feita a incubação a 37°C por 16h, exceto para o tratamento 4, no qual o período de incubação foi de 4h (LIANOU *et al.*, 2017).

A metodologia utilizada para avaliação da adesão bacteriana em microplacas de poliestireno foi adaptada a partir da técnica descrita por Stepanovic *et al.* (2007). Foram inoculados 200µL do inóculo tratado e incubado, em triplicata, em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (K12-096-Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil). Como controle positivo foi utilizado uma cepa de *Salmonella* Enteritidis pertencente à bacterioteca do CDPA, e como controle negativo utilizou-se o caldo TSB sem glicose. Quatro microlitros de norepinefrina 100 mM e dez microlitros de norepinefrina a 250 mM foram adicionados de acordo com o respectivo tratamento. As placas foram cobertas e incubadas aerobicamente por 24 horas a 12°C±1°C e 25°C±1°C.

Após o período de incubação, realizou-se a remoção do conteúdo de todos os poços. Em seguida realizou-se a lavagem da placa com 250µL de solução salina 0,9% estéril por três vezes. A placa foi levemente seca. Para fixação das células bacterianas foi adicionado de 200µL de metanol (Nuclear; Diadema, Brasil) em cada poço por 20 minutos. Após, foi feita a remoção do metanol e a secagem das placas. Realizou-se o processo de coloração das placas com 200µL de solução de cristal violeta de *Hucker* 2% (MediQuímica; Brasil) durante 15 minutos. Logo, foi feita a lavagem das placas com água corrente até que todo corante fosse removido da placa. Com a placa seca, foram adicionados 200 µL de ácido acético glacial 33% (Êxodo Científica; Sumaré, Brasil). A medida de densidade óptica foi realizada em leitor de ELISA (ELX800-Biotek; Winooski, Estados Unidos) utilizando-se um filtro no comprimento de onda de 550 nm. A OD de cada cepa foi obtida a partir da média aritmética dos respectivos três poços.

### 3.5.5 Avaliação da formação de biofilme

Para avaliar a capacidade de formação de biofilme das cepas, utilizou-se a OD final. As cepas foram classificadas quanto a sua capacidade de formar biofilme conforme descrito por Stepanovic *et al.* (2007). O ponto de corte para o teste foi definido como três desvios padrão acima da média do controle negativo ( $OD_n$ ); o valor de absorbância de cada amostra ( $OD_a$ ) média aritmética dos valores de 3 poços para cada amostra. As cepas foram classificadas como não aderentes ( $OD_a \leq OD_n$ ) ou aderentes ( $OD_n \geq OD_a$ ).

## 3.6 Experimento 3 - Pesquisa de genes associados à formação de biofilmes

O DNA das cepas de *S. Heidelberg* foi obtido através de termo-extração, conforme a metodologia descrita por Borsoi *et al.* (2009). A Tabela 1 apresenta os genes pesquisados, as sequências dos *primers* utilizados (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil), o tamanho dos *amplicons* e os trabalhos que serviram de referências para a obtenção dos *primers*.

Tabela 1 - Genes, sequências de *primers* utilizadas, tamanho dos *amplicons* (pb) e trabalhos de referência para obtenção das sequências dos *primers*.

Gene	Sequência dos <i>Primes</i>	Tamanho do <i>Amplicon</i> (pb)	Referência
<i>csgD</i>	F: TGCGGACTCGGTGCTGTTGT R: CAGGAACACGTGGTCAGCGG	123pb	Oliveira <i>et al.</i> (2014)
<i>adrA</i>	F: GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT R: GCCCATCAGCGCGATCCACA	92pb	Oliveira <i>et al.</i> (2014)
<i>sidA</i>	F: AATATCGCTTCGTACCAC R: GTAGGTAAACGAGGAGCA G	274pb	Halatsi <i>et al.</i> (2016)

Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e uma cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). Como controle negativo foi utilizada uma reação composta somente pelo *mix* de reagentes (sem a adição de DNA).

A Tabela 2 apresenta as concentrações dos reagentes do *mix*, as condições do termociclador e o número de ciclos de cada reação. Os protocolos foram adaptados a partir dos trabalhos anteriores (HALATSI *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Tabela 2 - Pesquisa de genes associados à formação de biofilme através da técnica de PCR: concentrações dos reagentes do *mix*, condições e número de ciclos do termociclador.

Protocolo	Concentrações dos reagentes do <i>mix</i>	Condições do termociclador	Número de ciclos
<i>csgD</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs	94°C – 30seg.	35
	(2,5mM), 1µL cada primer	60°C – 30seg.	
	(20pmol), 5U Taq Polimerase, 1,5µL MgCl <sub>2</sub> , 2µL DNA	72°C – 30seg.	
<i>adrA</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs	94°C – 30seg.	35
	(2,5mM), 1µL cada primer	60°C – 30seg.	
	(20pmol), 5U Taq Polimerase, 1,5µL MgCl <sub>2</sub> , 2µL DNA	72°C – 30seg.	
<i>sidA</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs	94°C – 30seg.	30
	(2mM), 1µL cada primer	52°C – 40seg.	
	(25pmol), 1U Taq Polimerase, 1,5µL MgCl <sub>2</sub> , 2µL DNA	72°C – 30seg.	

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Thermal Cycler-2720-Applied Biosystems; Foster City, Estados Unidos). Após a amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. A análise dos produtos amplificados foi feita através da visualização das bandas correspondentes em transluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia LKB Biotechnologies; Uppsala, Suécia) e da fotodocumentação digital (Alpha Innotech; San Leandro, Estados Unidos).

### 3.7 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi empregada para resumir os dados de cada tratamento, conforme o valor de absorbância das cepas. A comparação das médias de absorbância de acordo com o tratamento foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de médias de

Bonferroni. O programa PASW *Statistics* 18 (IBM, Hong Kong) foi utilizado para as análises, adotando como referência o nível de significância de 5%.

Conforme a classificação de Stepanovic *et al.* (2007), o ponto de corte para o teste foi definido como três desvios padrão acima da média do controle negativo ( $OD_n$ ); o valor de absorvância de cada amostra ( $OD_a$ ) média aritmética dos valores de 3 poços para cada amostra. As cepas foram classificadas como não aderentes ( $OD_a \leq OD_n$ ) ou aderentes ( $OD_n \geq OD_a$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do crescimento bacteriano após estímulo com catecolaminas e com meio acidificado

Na Tabela 3 estão descritas as médias e os desvios-padrão da densidade óptica obtida para cada tratamento para avaliação do crescimento de *S. Heidelberg* a 12°C e a 25°C.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão da densidade óptica para avaliação do crescimento de *S. Heidelberg* a 12°C e a 25°C submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamento	Médias ± Desvio-padrão (12°C)	Médias ± Desvio-padrão (25°C)
RPMI	0,181230 ± 0,092545 <sup>a,A</sup>	0,44871 ± 0,04287 <sup>a,B</sup>
NOR 100µM	0,181438 ± 0,108368 <sup>a,A</sup>	0,44356 ± 0,004394 <sup>a,B</sup>
NOR 250µM	0,182035 ± 0,112326 <sup>a,A</sup>	0,43143 ± 0,04789 <sup>b,B</sup>
RPMI Acidificado	0,070310 ± 0,027227 <sup>b,A</sup>	0,07295 ± 0,03401 <sup>c,A</sup>

Legenda:

Norepinefrina (NOR).

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, dentro da mesma temperatura.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as temperaturas, dentro do mesmo tratamento.

Quando a temperatura de incubação foi de 12°C, não se observou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no crescimento bacteriano após o estímulo com catecolaminas, independentemente da concentração utilizada. A 25°C, o tratamento com 250µM de norepinefrina apresentou significativamente ( $p < 0,05$ ) um menor crescimento bacteriano em relação ao estímulo com a menor concentração e ao tratamento contendo apenas o caldo RPMI. O estímulo com meio de cultura acidificado resultou em um menor crescimento de *S. Heidelberg* em relação aos demais tratamentos, independentemente da temperatura avaliada.

Comparando-se a influência da temperatura dentro de um mesmo tratamento, observou-se significativamente ( $p < 0,05$ ) maior crescimento bacteriano a 25°C para as duas concentrações de norepinefrina e para o meio contendo apenas

RPMI. Entretanto, não houve diferença significativa entre as temperaturas para o tratamento com o meio acidificado.

#### 4.2 Avaliação da adesão bacteriana e da capacidade de formação de biofilme após estímulo com catecolaminas e com meio ácido

Na Tabela 4 estão descritas as médias e os desvios-padrão da densidade óptica obtida para cada tratamento para avaliação da adesão de *S. Heidelberg* a 12°C e a 25°C.

Tabela 4 – Médias e desvios-padrão da densidade óptica para avaliação da adesão bacteriana por cepas de *S. Heidelberg* a 12°C e a 25°C submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamento	Médias ± Desvio-padrão (12°C)	Médias ± Desvio-padrão (25°C)
TSB	0,15855 ± 0,003566 <sup>a,A</sup>	0,17810 ± 0,07931 <sup>a,B</sup>
NOR 100µM	0,15380 ± 0,004864 <sup>a,A</sup>	0,17535 ± 0,009967 <sup>a,A</sup>
NOR 250µM	0,15275 ± 0,004613 <sup>a,A</sup>	0,17835 ± 0,10881 <sup>a,B</sup>
TSB Acidificado	0,19600 ± 0,07029 <sup>b,A</sup>	0,28125 ± 0,11235 <sup>b,B</sup>

Legenda:

Norepinefrina (NOR).

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, dentro da mesma temperatura.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as temperaturas, dentro do mesmo tratamento.

Independentemente da temperatura de incubação e da concentração de norepinefrina, não se observou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na capacidade de adesão após o estímulo. Entretanto, após o estímulo com meio de cultura acidificado, observou-se uma maior adesão bacteriana nas duas temperaturas avaliadas. Comparando-se a influência da temperatura de um mesmo tratamento, observou-se significativamente ( $p < 0,05$ ) maior adesão bacteriana a 25°C para todos os tratamentos, exceto para aquele com estímulo com 100µM norepinefrina.

Na Tabela 5 estão descritas as frequências absolutas e relativas das cepas que foram caracterizadas como produtoras de biofilmes nas temperaturas de 12°C e 25°C para os diferentes tratamentos.

Tabela 5 - Frequências absolutas e relativas das cepas produtoras de biofilmes a 12°C e a 25°C submetidos a diferentes tratamentos (n=20).

Tratamento	Cepas produtoras a 12°C (%)	Cepas produtoras a 25°C (%)
TSB	0	6 (30)
NORA 100µM	0	1 (5)
NORA 250 µM	0	1 (5)
TSB acidificado	14 (70)	6 (30)

Legenda:

Norepinefrina (NOR).

Não foram observadas cepas formadoras de biofilme a 12°C, com ou sem o estímulo com norepinefrina. Entretanto, o meio acidificado aumentou o número de cepas que formaram biofilme. A 25°C, apenas uma cepa formou biofilme após o estímulo com a norepinefrina. 30% das cepas formaram biofilme sem nenhum estímulo ou com o estímulo de meio acidificado.

### 4.3 Pesquisa de genes associados à formação de biofilme

Foram detectados três perfis de genes (*adrA*, *csgD* e *sidA*) nas cepas analisadas. O gene *adrA* esteve presente em todas as amostras avaliadas, *sidA* em 95% (19/20) e *csgD* em 55% (11/20) conforme mostra no APÊNDICE A.

## 5. DISCUSSÃO

Para avaliar a influência das catecolaminas no crescimento de *S. Heidelberg*, as cepas foram submetidas a estímulos com duas concentrações (100  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$ ) de norepinefrina em caldo RPMI. O RPMI é um caldo de baixa disponibilidade de nutrientes, incluindo ferro, e é usado para imitar o ambiente encontrado por bactérias no hospedeiro (LYTE *et al.*, 2011). As catecolaminas compartilham uma similaridade da estrutura química com grupos de sideróforos bacterianos, favorecendo a absorção de ferro em ambientes pobres em nutrientes, como o intestino do hospedeiro (KINNEY *et al.*, 2000; LYTE *et al.*, 2011). A capacidade da norepinefrina de ativar o crescimento em meios ricos em nutrientes tem sido associada com a ligação da norepinefrina ao ferro férrico complexado com lactoferrina e transferrina e sua redução para Fe (II), para o qual as proteínas têm uma afinidade mais baixa (SANDRINI *et al.*, 2010). Entretanto, não se observou aumento no crescimento bacteriano após estimulação com norepinefrina. Não há estudos que avaliem a influência dessas substâncias no crescimento desse sorotipo específico. A 12°C o crescimento de ambas as concentrações foi semelhante ao crescimento no meio de cultura sem adição de norepinefrina. A 25°C, a maior concentração deste hormônio reduziu significativamente o crescimento bacteriano.

Segundo Lyte & Ernst (1992) e Freestone *et al.* (2002) as respostas bacterianas aos hormônios do estresse das catecolaminas são marcadamente dependentes da concentração. Quanto menor o inóculo bacteriano, mais responsiva a bactéria é a catecolamina (FREESTONE *et al.*, 2007; LYTE *et al.*, 2011). A concentração de inóculo utilizada no presente estudo ( $10^2$  UFC/mL) é considerada baixa para Freestone *et al.* (2007). O efeito do crescimento dose-resposta das catecolaminas tanto para a *Yersinia enterocolitica* quanto para a *Escherichia coli* O157: H7 mostra que, em uma base dependente da concentração, a exposição à norepinefrina tinha a habilidade mais potente entre as catecolaminas para estimular o crescimento bacteriano (FREESTONE *et al.*, 2007). As catecolaminas podem atuar de uma maneira sinérgica de promover o crescimento bacteriano. *E. coli* O157: H7 e *S. enterica* são capazes de responder à epinefrina, a densidades populacionais muito baixas, que são reflexo do impacto bacteriano que provavelmente estão presentes nos estágios iniciais de uma infecção, existe uma ordem de preferência de catecolaminas, em respostas ao crescimento à

norepinefrina e a dopamina sendo pelo menos um log maior que as epinefrina ( $P < 0,0001$ ). (FREESTONE *et al.*, 2002).

Diferentemente do encontrado no presente estudo, dados da literatura demonstram que as catecolaminas aumentam o crescimento de diversas espécies de bactérias Gram negativas. As concentrações de norepinefrina que foram utilizadas no presente estudo estão de acordo com aquelas usualmente utilizadas por outros pesquisadores (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015; FREESTONE *et al.*, 2007; O'DONNELL *et al.*, 2006). Estudos preliminares indicaram que o uso de concentrações mais elevadas de norepinefrina (500  $\mu\text{M}$ ) resulta em menor crescimento bacteriano a 25°C (dados não mostrados). Esta informação também pode justificar o menor crescimento bacteriano após estimulação com norepinefrina a 250  $\mu\text{M}$ .

A formação de biofilmes por *Salmonella* spp. é uma grande preocupação para a indústria de alimentos, devido à permanência das bactérias nas superfícies, oferecendo um constante risco de contaminação do produto final (ZIECH *et al.*, 2014). Por esta razão, os estudos que avaliam a capacidade de adesão de microrganismos patogênicos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos oferecem subsídios importantes aos profissionais que atuam na área. Neste contexto, além de avaliar a influência das catecolaminas no crescimento de *S. Heidelberg*, o presente estudo também avaliou a influência destes tratamentos na capacidade de adesão das cepas. A metodologia adaptada a partir do trabalho de Stepanovic *et al.* (2007) permitiu avaliar a adesão bacteriana das cepas estudadas. A utilização do caldo TSB sem glicose é justificada pelo fato de este ser um meio de cultura pobre em nutrientes, condição que favorece a adesão bacteriana (RODRIGUES *et al.*, 2009). As microplacas de poliestireno foram selecionadas como o objetivo de mimetizar alguns dos materiais utilizados na indústria de alimentos (PIRAS *et al.*, 2015), além de serem eficientes para a avaliação dos objetivos propostos.

Estudos têm demonstrado que a norepinefrina aumenta a adesão de microrganismos patogênicos em superfícies bióticas (BANSAL *et al.*, 2007; EVEREST, 2007) e abióticas (SANDRINI *et al.*, 2014; HILLER, 2017). Entretanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças significativas na capacidade de adesão das cepas após o estímulo com norepinefrina, independentemente da temperatura de incubação e da concentração do hormônio. Estes resultados diferem do estudo realizado por Hiller (2017), no qual se observou uma maior formação de

biofilme após estímulo com norepinefrina a uma concentração de 100 $\mu$ M, quando a temperatura de incubação foi de 12°C. Entretanto, é importante ressaltar que o estudo de Hiller (2017) foi realizado com cepas de *S. Enteritidis*, sorovar diferente do sorovar testado no presente trabalho. Borges *et al.* (2018) já demonstraram que o sorovar pode influenciar parcialmente a produção de biofilme. Desta forma, a diferença dos sorovares avaliados poderia justificar as variações encontradas entre os dois estudos.

Patógenos entéricos estão expostos a diversas condições estressantes durante seu ciclo de vida no hospedeiro: pH ácido do estômago, atividade dos sais biliares, redução na concentração de oxigênio e presença de flora microbiana competidora (EVEREST, 2007). Tem sido demonstrado que as cepas de *S. Enteritidis*, quando submetidas a um ambiente ácido e frio durante o processamento, apresentam maior resistência a baixo pH, aumentando a capacidade de sobreviver à barreira gástrica em humanos (SILVA *et al.*, 2016). A sobrevivência em um ambiente de pH ácido, como no estômago após a ingestão, e dentro dos fagossomas e fagolisossomos das células epiteliais intestinais, é importante para o desenvolvimento de doenças pelos patógenos gastrointestinais (VARSAKI *et al.*, 2015). A exposição da bactéria a condições levemente ácidas ou alcalinas pode conferir maior resistência a condições letais e, assim, resultar em um aumento do risco de doenças transmitidas por alimentos (YANG *et al.*, 2014). Neste contexto, além do estímulo com catecolaminas, o crescimento e a adesão bacteriana também foram avaliados sob condições de estresse em meio acidificado (pH 3). Um menor crescimento significativo de *S. Heidelberg* foi observado no tratamento com meio acidificado, independentemente da temperatura de incubação. Como as cepas avaliadas não foram pré-expostas a condições de ácido subletal, esse resultado era esperado, uma vez que as condições ácidas tendem a reduzir o crescimento ou mesmo causar a morte bacteriana (TORTORA *et al.*, 2017). Por outro lado, a adesão de *S. Heidelberg* foi significativamente maior no grupo tratado com meio acidificado, independente da temperatura de incubação. O uso do meio acidificado resultou em 70% das cepas formadoras de biofilme a 12°C e 30% a 25°C. Estudos publicados anteriormente apresentam dados conflitantes sobre a influência do pH ácido do meio na capacidade de formação de biofilmes. Segundo Nguyen *et al.* (2014), condições de pH baixo diminuem a taxa de formação de biofilme, influenciando principalmente a adesão inicial das bactérias. Em contraste, Costa *et al.* (2014) observaram uma alta capacidade de adesão sob condições de pH ácido,

demonstrando que condições de estresse para células bacterianas tendem a favorecer uma maior formação de biofilme.

A 12°C não se observou formação de biofilme após o estímulo com norepinefrina, independentemente da concentração. A 25°C, apenas uma cepa produziu estas estruturas em cada uma destas concentrações. No estudo de Hiller (2017) com cepas de *S. Enteritidis*, observou-se cepas formadoras de biofilme após estímulo com norepinefrina a 50 µM (6,7%) e a 100 µM (40%) a 12°C. Para a temperatura de 25°C, 76,7% das cepas formaram biofilme após estímulo com norepinefrina a 50 µM e 83,3% a 100 µM.

Diversos fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não apenas da fisiologia do microrganismo e seus fatores de crescimento, mas também da natureza do substrato (MACEDO, 2006). Dentre estes destacam-se: a genética, a virulência e a resistência do microrganismo; a nutrição; a área e o material da superfície e a velocidade do fluxo de líquidos (MEDONLINE,2008).

As bactérias são capazes de desenvolver várias respostas ao estresse sob condições ácidas e alcalinas. Um possível mecanismo é que as bactérias regulam a composição lipídica da membrana celular em resposta à mudança de pH para manter um balanço líquido-cristalino adequado. Estas mudanças na proporção de ácidos graxos saturados, insaturados e cíclicos podem afetar a fluidez da membrana bacteriana, o que permite que os prótons fluem mais rapidamente para dentro ou para fora das células para manter a homeostase do pH (YUK; MARSHALL, 2004). Segundo Foster (1991), *S. Typhimurium* tem a capacidade de sobreviver a um pH extremamente baixo (pH 3,0 a 4,0) se primeiro for submetida a condições de pH de acidez moderada ou próximo à neutralidade (pH 5,5 a 6,0). A tolerância ao ácido é uma resposta fenotípica que se refere ao aumento da resistência a condições extremas de pH após adaptação a ambientes ácidos subletais (GOODSON; ROWBURY, 1989; FOSTER; HALL, 1990; KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2004). Como o pH dos produtos alimentícios pode variar significativamente dependendo dos procedimentos de processamento e preservação, a investigação detalhada do efeito do pH na resistência ácida é de grande importância (KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2004). O desenvolvimento da resistência ácida já foi descrito em um grande número de bactérias patogênicas, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *S. Typhimurium* (GOODSON; ROWBURY, 1989; FOSTER; HALL, 1990; KROLL; PATCHETT, 1992; FOSTER, 1995;

O'DRISCOLL *et al.*, 1996; BEARSON *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 1997; LOU; YOUSEF, 1997). Segundo Bearson *et al.* (1997), as células crescem ativamente em pH inicial de 7,7 e rapidamente morrem quando são submetidas a condições de pH abaixo de 4,0. Quando adaptamos estas células a condições ácidas medianas de pH 5,8, ocorre um aumento da tolerância à acidez mais extremas, como o pH 3,0 (FOSTER, HALL, 1990). Wilmes-Riesenberg *et al.* (1996) examinaram culturas de *S. Typhimurium* pré-adaptadas a um pH 5,8 para uma exposição em pH 3,3 e observaram que as culturas já adaptadas resistiram mais à acidez do que as culturas que não foram adaptadas.

Além do estímulo com catecolaminas e com meio acidificado, também foi avaliada a influência da temperatura no crescimento e na adesão das cepas. Observou-se um crescimento bacteriano significativamente maior quando a temperatura de incubação foi de 25°C para todos os tratamentos, exceto para o tratamento com meio acidificado. Estes resultados possivelmente se devem ao fato de que o crescimento de *Salmonella* é maior em temperaturas mais próximas da faixa ideal (35°C a 37°C), enquanto que em temperaturas mais baixas o crescimento é mais lento e/ou reduzido (TORTORA *et al.*, 2003). Similarmente, a adesão bacteriana foi maior quando a temperatura de incubação foi de 25°C para todos os tratamentos, exceto para o tratamento com norepinefrina a 100 µM. Estudos anteriores já demonstraram a forte influência da temperatura na formação do biofilme (OLIVEIRA *et al.*, 2014; CABARKAPA *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2018). A produção de *curli* e de celulose, estruturas essenciais para a formação dos biofilmes, é aumentada entre 25°C e 30°C (GERSTEL; RÖMLING, 2003; STEPANOVIC *et al.*, 2003), o que faz com que a formação de biofilmes seja maior nesta faixa de temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2014; CABARKAPA *et al.*, 2015).

Segundo a Instrução Normativa nº 210 (BRASIL, 1998), a temperatura da sala de cortes deve ser de no máximo 12°C. Lotes positivos para *Salmonella spp.* podem contaminar a planta frigorífica, pois na sala de cortes *Salmonella* encontra um microambiente favorável para a adesão devido à presença de resíduos de carcaças e pelo desgaste das placas de corte (ZIECH *et al.*, 2014). No entanto, mesmo sob condições térmicas desfavoráveis, foi possível observar que as cepas de *S. Heidelberg* foram capazes não só de crescer, mas também de aderir às superfícies. Embora a adesão não seja suficiente para formar biofilmes, é importante notar que os biofilmes de monoespécie, como os avaliados *in vitro*, são raros em ambientes de manipulação de ambientes. A interação entre microrganismos de um biofilme

multiespécie pode interferir na capacidade de adesão de diferentes espécies bacterianas (BURMOLLE *et al.*, 2014; CARVLHO, 2019). A temperatura de 25°C é uma temperatura ambiente, sendo está encontrada na residência dos consumidores e em muitos ambientes com manipulação dos produtos alimentícios. No presente estudo, foi possível encontrar cepas produtoras de biofilme a esta temperatura. A formação de biofilme por *Salmonella* spp. é uma grande preocupação para a indústria alimentícia devido à permanência de bactérias nas superfícies, oferecendo um risco constante de contaminação do produto final (ZIECH *et al.*, 2014).

Neste estudo, observou-se alta frequência dos genes *adrA* e *sidA*, e menor frequência para o gene *csgD* nas cepas de *S. Heidelberg* analisadas. Hiller (2017) pesquisou os genes *adrA* e *csgD* em *S. Enteritidis*, detectando ambos em todas as cepas avaliadas. Halasti *et al.* (2016) pesquisou o gene *sidA* em 155 sorotipos de *Salmonella* spp., detectando este gene em todas as cepas avaliadas. O gene *sdia* não regula os sistemas de secreção associados à virulência de *Salmonella*, mas regula fatores acessórios que podem contribuir para a sobrevivência intestinal (HALASTI *et al.* 2016). Yin *et al.* (2018) pesquisaram os genes *adrA*, *sidA* e *csgD*, sendo que os três genes foram identificados em mais de 95% das cepas de *Salmonella*. No presente estudo, o gene *csgD* apresentou uma menor frequência de detecção. Uma das possibilidades para a diferença destes resultados é a influência do sorovar, uma vez que alguns genes estão associados a sorovares específicos (BORGES *et al.*, 2019). Como principal regulador transcricional, este gene é a principal unidade de controle e integração para a formação de biofilme de *Salmonella* devido à regulação da expressão de substâncias da matriz extracelular, incluindo *curli* e celulose (GERSTEL; RÖMLING, 2003). As bactérias com expressão de *csgD* regulada positivamente são responsáveis por gerar a matriz extracelular e por formar a estrutura de biofilme que envolve as bactérias que não o expressam (LIU *et al.* 2014). Freestone *et al.* (2008) descrevem que os perfis dos genes regulados pelas duas catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) são diferentes um do outro. Uma visão holística do entendimento de como o estresse altera a susceptibilidade às infecções revela que as bactérias respondem ao inevitável fluxo de neurohormônios que ocorre durante o estresse e que elas podem ter múltiplos sistemas de resposta para o uso de catecolaminas em seu crescimento e indução de processos patogênicos.

Trabalhos avaliando a influência de meios acidificados e de diferentes concentrações de norepinefrina no crescimento e na adesão de *S. Heidelberg* de

origem avícola são de suma importância para o setor avícola e também do ponto de vista de saúde pública, uma vez que se trata de um microrganismo com alto potencial zoonótico. Ácidos orgânicos são utilizados nos abatedouros, na água de bebida das aves no pré abate e também nas formulações de rações (COLLA *et al.*, 2012; SANTIN *et al.*, 2017). O uso indiscriminado dos ácidos na avicultura industrial pode tornar cepas de salmonelas resistentes e este pode ser um fator de manutenção de *Salmonella* a campo e no abatedouro.

## 6. CONCLUSÕES

- A estimulação com norepinefrina não influenciou o crescimento das cepas de *Salmonella* Heidelberg, independentemente da concentração de catecolamina e da temperatura.
- O emprego de meio acidificado resultou em uma redução significativa do crescimento de *Salmonella* Heidelberg em temperaturas de incubação de 12°C e 25°C.
- Em relação à adesão bacteriana, não se observou influência do estímulo das catecolaminas nas cepas de *Salmonella* Heidelberg, independentemente da concentração utilizada, para temperaturas de incubação de 12°C e 25°C.
- O emprego de meio acidificado resultou em um aumento significativo da adesão das cepas *Salmonella* Heidelberg em ambas as temperaturas testadas, indicando que o meio acidificado favorece o processo de formação de biofilme.
- Observou-se três perfis de genes (*adrA*, *csgD* e *sidA*) para as cepas analisadas, com alta frequência de detecção dos genes *adrA* e *sidA*, sendo superior à frequência do gene *csgD*, presente em 50% das cepas avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- ABPA, 2015. Associação Brasileira de Proteína Animal. História da avicultura no Brasil. Disponível em: <[http://www.ubabef.com.br/a\\_avicultura\\_brasileira/historia\\_da\\_avicultura\\_no\\_brasil](http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil)>. Acesso em: 24 jul. 2018
- ABPA, 2018. Associação Brasileira de Proteína Animal - Relatório anual de 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2019.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A., BROUSSOLLE, V., COLIN, P., NGUYEN-THE, C., PIETRO, M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology** v.213, 2015, p.99-109.
- ANDREATTI, R.L. Panorama da *Salmonella* spp. na América do Sul. In: AVISULAT – CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE AVICULTURA, SUINOCULTURA E LATICÍNIOS, 4, 2014, Bento Gonçalves. **Palestras**. Bento Gonçalves: ASGAV, SIPS E SINDILAT/RS, 2014.
- BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J. A. Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7, 2006. Chapecó SC, 2006, p.95-103.
- BANSAL, T.; ENGLERT, D.; LEE, J.; HEGDE, M.; WOOD, T.K.; JAYARAMAN, A. Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. **Infection and Immunity**. v.75, n.9, 2007, p.4597–4607
- BARNHART, M.M.; CHAPMAN, M. R. *Curl*i biogenesis and function. **Annual Review of Microbiology**, v.60, 2006, p. 131–147.
- BEARSON, S., BEARSON, B., FOSTER, J.W. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.147, n.2, 1997, p.173-180.
- BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso - NEMO**, Maringá, v.2, n.1, 2010, p.25-51.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doença das aves**. Campinas: FACTA, 2009, p.435-454.
- BERK, P.A., JONGE, R., ZWIETERING, M. H., ABEE, T., & KIEBOOM, J. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.4, 2005, p.859-866.

BOARI, C.A, ALVES, M.P., TEBALDI, V.M.T., SAVIAN, T.V., PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.4, 2009, p.886-895.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA, S.N.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from poultry sources in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, *in press*. v.21, n.1, 2019, p.1-8.

BORGES K.A., FURIAN T.Q., SOUZA S.N., MENEZES R., TONDO E.C., SALLE C.T.P., MORAES H.L.S.; NASCIMENTO V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.38, n.1, 2018, p.71-76.

BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.I.; AVANCINI, C.A.M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofor. **Ciência Rural**, v.36, n.5, 2006, p.1474-1479.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.; MORAES, H.L.; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, n.4, 2009, p.750-758.

BORSOI, A.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.42, n.1, 2011, p. 266-273.

BORSOI, A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CALEFI, A. S.; Palermo-Neto, J. Efeito do estresse por frio no isolamento bacteriano e em células imunes de aves SPF desafiadas com *Campylobacter jejuni*. In: XIV Seminário Técnico Científico de Aves e Suínos, 2015, Curitiba, PR. **Anais do XIV Seminário Técnico Científico de Aves e Suínos - Avisui 2015**, 2015.

BRASIL. Instrução Normativa, SDA nº 126, 03 de novembro de 1995. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, 06 nov. 1995. Nº 212, seção 1, p.17694-17698.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de carne de Aves. **Diário Oficial [Da] União**, Poder Executivo, Brasília DF, 10 nov 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em; 24 jan. 2019.

BROOKS, J.D., FLINT, S.H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science and Technology**. v.43, n.12, 2008, p.2163–2176.

BROWN, J.L., ROSS, T., MCMEEKIN, T.A., NICHOLS, P.D. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. **International Journal of Food Microbiology**. v.37, n.2-3, 1997, p.163-173.

CABARKAPA, I.; SKRINJAR, M.; LEVIC, J.; KOKIC, B.; BLAGOJEV, N.; MILANOV, D.; SUVAJDZIC, L. Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. **Acta Veterinaria-Beograd**, v.65, n.3, 2015, p.371-389.

BURMOLLE, M.; REN, D.; BJARNSHOLT, T.; SORENSEN, S.J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**. v.22, n.2, 2014. p.84-91.

Carvalho, D. **Formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*: Aplicação de modelagem preditiva e alternativas para controle**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>>. Acesso em: 08 jan. 2019.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A.M. Summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v.69, n.5, 2006, p.1150-1153.

COLLA, F.L.; RODRIGUES L.B.; DICKEL, E.L.; BORSOI, A.; NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.4, 2012, p.289-292.

CONCEIÇÃO, R.C.S.; STURBELLE, R.T.; TIMM, C.D.; LEITE, F.P.L. Inducers and autoinducers on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium motility, growth and gene expression. **Ciência Rural**. v.45, n.12, 2015, p.2201-2206.

COSTA, J.C.M.; ESPESCHIT, I.F.; PIERI, F.A.; BENJAMIN, L.A.; MOREIRA, M.A.S. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Ciência Rural**. v.44, n.4, 2014, p.666-671.

CURY, HUMBERTO A. **Avaliação de aditivos na água de bebida para controle de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg em frangos de**

**corte**. 2013. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.2, 2002, p.167–193.

EFSA. European Food Safety Authority (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**. v.15, 2017, p.1–228.

EVEREST, P. Stress and bacteria: microbial endocrinology. **Gut**, v.56, n.8, 2007, p.1037-1038.

FACTA - Fundação Apinco de Ciências e Tecnologia Avícola. Alternativas para o Controle de *Salmonella* em aves. 2016. Disponível em: <<http://facta.org.br/alternativas-para-o-controle-de-salmonella-em-aves/>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

FERREIRA, L.C. **Aspectos microbiológicos da conservação de polpas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): qualidade, hygiene, adaptação de bactérias ao estresse ácido e isolamento de microrganismo com potencial para bioconservação**. 2007. 110p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.2, 1990, p.771-778.

FOSTER, J.W. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. **Journal of Bacteriology**. v.173, n.21, 1991, p.6896–6902.

FOSTER, J.W. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, n.4, 1995, p.215-237.

FREESTONE, P.P.E.; HAIGH, R.D.; WILLIAMS, P.H.; LYTE, M. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. **FEMS Microbiology Letters**, v.172, n.1, 1999, p.53-60.

FREESTONE, P.P.; WILLIAMS, P.H.; HAIGH, R.D.; MAGGS, A.F.; NEAL, C.P.; LYTE, M. Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. **Shock** v.18, n.5, 2002, p.465–470.

FREESTONE, P.P.; HAIGH, R.D.; LYTE, M. Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. **FEMS Microbiology Letters**. v.269, n.2, 2007, p.221-228.

FREESTONE, P.P.; SANDRINI, S.M.; HAIGH, R.D.; LYTE, M. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. **Trends in Microbiology**. v.16, n.2, 2008, p.55-64.

GERSTEL, U.; RÖMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. **Environmental Microbiology**. v.3, n.10, 2001, p.638–648.

GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**. v.154, n.10, 2003, p.659-67.

GERSTEL, U.; PARK, C.; RÖMLING, U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. **Molecular Microbiology**. v.49, n.3, 2003, p.639-654.

GIAOURIS, E., CHORIANOPOULOS, N., SKANDAMIS, P., & NYCHAS, G.J. Attachment and Biofilm Formation by *Salmonella* in Food Processing Environments. **Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen**. Intech Open Access Publisher, 2012, p.157–180. 2012.

GIAOURIS, E.; SAMOILIS, G.; CHORIANOPOULOS, N.; ERCOLINI D.; NYCHAS, G.-J. Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. **International Journal of Food Microbiology**. v.162, n.1, 2013, p.105–113.

GOODSON, M.; ROWBURY, R.J. Resistance of acid-habituated *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. **Letters in Applied Microbiology**. v.8, n.6, 1989, p.211-214.

GRAVANI, R.B. Salmonellosis – *Salmonella* food poisoning. **Dairy Food Sanit**, v.4, 1992, p.227.

HALASTI, K., OIKONOMOU, I., LAMBIRI, M., MANDILARA, G., VATOPOULOS, A., & KYRIACOU, A. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. **FEMS Microbiology Letters**. v.259, 2016, n.2, p.201-207.

HIGA, J.S. Biofilmes bacterianos: vivendo em comunidade. Disponível em: <<http://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/bacteriologia-oral/biofilmes-bacterianos-vivendo-em-comunidade/>>. Acesso em: 20 out 2018.

HILLER, C. **Influência das catecolaminas norepinefrina e epinefrina na formação de biofilme em isolados de *Salmonella* Enteritidis**. 2017. 40p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Avícola) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, 1997, p.55-62.

KROLL, R.G., PATCHETT, R.A. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**. v.14, n.5, 1992, p.224-227.

KINNEY, K.S., AUSTIN, C.E., MORTON, D.S. & SONNENFELD, G. Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacterial – mechanistic studies. **Life Sciences**. v.67, n.25, 2000, p.3075-3085.

KOUTSOUMANIS, K.P.; SOFOS, J.N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, n.4, 2004, p.321-326.

LIANOU, A.; HYCHAS, G-J.E.; KOUTSOUMANIS, K.P. Variability in the adaptive acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains. **Food Microbiology**. v.62, 2017, p.99-105.

LIU, Z.; NIU, H.; WU, S.; HUANG, R. Review: *csgD* regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. **Emerging Microbes and Infections**, v.3, n.1, 2014, p.1-5.

LOU, Y., YOUSEF, A.E. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.4, 1997, p.1252-1255.

LYTE, M.; VULCHANOVA, L.; BROWN, D.R. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. **Cell and Tissue Research**. v.343, n.1, 2011, p.23–32.

LYTE, M.; ERNST, S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. **Life Sciences**. v.50, n.3, 1992, p.203-12.

MAKARITI, I.P., PRINTEZI, A., KAPETANAKOU, A.E., ZEAKI, N., SKANDAMIS, P.N. Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of *Listeria monocytogenes* in response to acid and osmotic stress. **Food Microbiology**. v.45, 2015, p.231-244.

MENCONI, A.; WOLFENDEN, A.D.; SHIVARAMAIAH, S.; TERRAES, J.C.; URBANO, T.; KUTTEL, J.; KREMER, C.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, v.90, n.3, 2011, p.561-565.

MILAN, C., TIMM, C.D. Fatores de virulência associados à formação de biofilme por *Salmonella enterica*: minirrevisão. **Science and Animal Health**, v.3, n.1, 2015, p.94-102.

MORENO, I. Catecolaminas: conceitos de catecolaminas. **Enciclopédia temática Knoow**. 2017. Disponível em: <http://knoow.net/cienmedicas/medicina/catecolaminas/>. Acesso em: 20 out 2018.

MUNIZ, E.C. Atualidades no estudo das salmoneloses aviárias. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. Chapecó SC, p.13-26, 2012.

NGUYEN, H.D.N., YANG, Y.S., YUK, H.G. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT - Food Science and Technology**. v.55, n.1, 2014, p.383–388.

O'DONNELL, P.M.; AVILES, H.; LYTE, M.; SONNENFELD, G. Enhancement of in vitro growth of pathogenic bacteria by norepinephrine: importance of inoculum density and role of transferrin. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n.7, 2006, p.5097-5099.

O'DRISCOLL, B.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, n.5, 1996, p.1693-1698.

OLIVEIRA, D.C.; FERNANDES JÚNIOR, A.; KANENO, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; SILVA, N.C.; RALL, V.L. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, n.6, 2014, p.478-483.

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL. Bioseguridad y resistencia a los antimicrobianos. 2012

PAPENFORT, K.; BASSLER, B.L. *Quorum sensing* signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**. v.14, n.9, 2016, p.576–588.

PEREZ, K.J.; MARTINS, F.S.; CARA, D.C.M.; NICOLI, J.R.; TONDO, E.C. Evaluation of intestinal invasion in germ-free mice challenged with acid-adapted and nonacid-adapted *Salmonella* Enteritidis SE86 and *Salmonella* Typhimurium ST99. **Journal of Food Safety**. v.32, n.1, 2011, p.108-114.

PIRAS, F.; FOIS, F.; CONSOLATI, S.G.; MAZA, R.; MAZZETTE, R. Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**. v.78, n.10, 2015, p.1875-1878.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. *Salmonella* Heidelberg - Ceftiofur-related resistance in human and retail chicken isolates. 2007.

RODRIGUES, L.B.; DOS SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N.; TAGLIARI, V.Z.; DE OLIVEIRA, A.P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S.C.; TAGLIETI, R.M.; DICKEL, E.L.; NASCIMENTO, V.P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilmes em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.3, 2009, p.225-230.

RÖMLING, U.; ROHDE, M.; OLSÉN, A.; NORMARK, S.; REINKÖSTER, J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. **Molecular Microbiology**. v.36, n.1, 2000, p.10-23.

RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**. v.153, n.4, 2002, p.205–212.

RÖMLING, U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, n.11, 2005, p.1234-1246.

RÖMLING, U. Cellulose Biosynthesis in *Enterobacteriaceae*. In: BROWN JR., R.M.; SAXENA, I.M. (Ed.). **Cellulose: Molecular and Structural Biology**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands. cap.7, 2007, p.107-122.

ROSA, G.; SPOSITO, P.H.; GONÇALVES, A.P.P.; HAFEMANN, D.C.M., MERLINI, L.S. Pesquisa de *Salmonella* sp. em carne de suíno e frango comercializadas na região noroeste do estado do Paraná – Brasil. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** – Goiânia. v.11, n.21, 2015, p.1493-1498.

SANDRINI, S.M.; SHERGILL, R.; WOODWARD, J.; MURALIKUTTAN, R.; HAIGH, R.D.; LYTE, M.; FREESTONE, P.P. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones release the defense proteins in the transference and lactoferrin. **Journal of Bacteriology**. v.192, n.2, 2010, p.587-594.

SANDRINI, S.; ALGHOFAILI, F.; FREESTONE, P.; YESILKAYA, H. Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. **BMC Microbiology**, v.14, n.180, 2014, p.1-12.

SANTIN, E.; HAYASHI, R.M.; WAMMES, J.C.; GONZALEZ-ESQUERRA, R.; CARAZZOLLE, M.F.; FREIRE, C.C.M.; MONZANI, P.S.; DA CUNHA, A.F. Phenotypic and genotypic features of a *Salmonella* Heidelberg strain isolated in broilers in Brazil and their possible association to antibiotics and short-chain organic acids resistance and susceptibility. **Frontiers in Veterinary Science**. v.4, 2017, p.1-13.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.17, n.1, 2004, p.14–56.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.de.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.de C.L.; DUTRA, R.A.F.D.; FILHO, J.L.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciênicas & Saúde Coletiva**. v.13, n.5, 2008, p.1675-1683.

SILVA, S.Q.; DOS SANTOS, M.T.; PAES, A.S.; VANETTI, M.C.D. Acid and low temperature treatments on *Salmonella* Enteritidis inoculated in pork and its subsequent survival in simulated gastric fluid. **Ciência Rural**. v.46, n.3, 2016, p.530-535.

SOLA, M.C.; DE OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Mecanismos de *quorum sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.8, n.14, 2012, p.1419-1441.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; GIRO´N, J.A; KAPER, J.B. *Quorum Sensing* is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**. v.183, n.17, 2001, p.5187–5197.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; JARVIS, B.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.100, n.15, 2003, p.8951–8956.

STEPANOVIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; MIJAV, V.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**. v.20, n.3, 2003, p.339-343.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, L.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. **APMIS**. v.115, n.8, 2007, p.891–899.

STEVENS, M.P. Modulation of the interaction of enteric bacteria with intestinal mucosa by stress-related catecholamines. *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health*. Editor: M. Lyte; P.P.E. Freestone. **Springer Press**. 2010, p.111-134.

SUO, B.; HE, Y.; TU, S.-I.; SHI, X. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.7, n.6, 2010, p.619-628.

THERON, M.M.; LUES, J.F.R. Organic acids and meat preservation: a review. **Food Reviews International**. v.23, n.2, 2007, p.141-158.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 935 p.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 324 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

VAN HOUTDT R.; MICHIELS C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**. v.109, n.4, 2010, p.1117-1131.

VARSAKI, A., MURPHY, C., BARCZYNSKA, A., JORDAN, K. E CARROLL, C. The acid adaptive tolerance response in *Campylobacter jejuni* induces a global response, as suggested by proteomics and microarrays. **Microbial biotechnology**, published by John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology, *Microbial Biotechnology*, v.8, 2015, p.974–988.

WHITE, D. The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. In: WHITE, D. *Growth and Cell Division*. New York: Oxford University Press, 2007. 583 p.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Salmonella. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/salmonella/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/)> Acesso em: 08 jan 2019.

YANG, Y.; KADIM, M. I.; KHOO, W. J.; ZHENG, Q.; SETYAWATI, M. I.; SHIN, Y.J.; YUK, H.G. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. **International Journal of Food Microbiology**. v.191, 2014, p.24–31.

YIN, B.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; DONG, P.; MAO, Y.; LIANG, R.; NIU, L.; LUO, X. The Characterization of Biofilm Formation and Detection of Biofilm-Related Genes in *Salmonella* Isolated from Beef Processing Plants. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.15, n.10, 2018, p.660-667.

YUK, H.G.; MARSHALL, D.L. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n.6, 2004, p.3500-3505.

ZAKIKHANY, K.; HARRINGTON, C. R.; NIMTZ, M.; HINTON, J.C.; RÖMLING, U. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**. v.77, n.3, 2010, p.771–786.

ZIECH, R.E., LAMPUGNANI, C., PERIN, A.P., VIANA, C., RALL, V.L.M., BERSOT, L.S. Formação de biofilmes por *Salmonella* sp. Isoladas de esteiras condutoras de frango em salas de cortes de plantas processadoras de aves. In: **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de alimentos – Microal 2014 - Blucher Food Science Proceedings**. n.1, v.1, 2014, p.217-218.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v.39, n.6, 2001, p.1452–1463.

APÊNDICE A - Isolados de *Salmonella* Heidelberg: identificação, ano, fonte de isolamento e perfil de genes associados a formação de biofilme.

<b>Amostra</b>	<b>Fonte de isolamento</b>	<b>Ano</b>	<b>Gene</b>
1	fezes	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
2	suabe de arrasto	2017	<i>adrA e csgD</i>
3	fezes	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
4	suabe de arrasto	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
5	suabe de arrasto	2017	<i>AdrA, sidA e csgD</i>
6	suabe de arrasto	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
7	fezes	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
8	suabe de arrasto	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
9	suabe de arrasto	2017	<i>adrA e sidA</i>
10	suabe de arrasto	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
11	suabe de arrasto	2017	<i>adrA e sidA</i>
12	fezes	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
13	fezes	2017	<i>adrA e sidA</i>
14	fezes	2017	<i>adrA e sidA</i>
15	suabe de arrasto	2017	<i>adrA e sidA</i>
16	fezes	2017	<i>adrA e sidA</i>
17	suabe de arrasto	2017	<i>adrA e sidA</i>
18	fezes	2017	<i>adrA e sidA</i>
19	suabe de arrasto	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>
20	suabe de arrasto	2017	<i>adrA, sidA e csgD</i>

**ARTIGO**

Artigo submetido à Revista *Current Microbiology*: “*Growth and adhesion of Salmonella Heidelberg isolated from poultry are not influenced by norepinephrine*”

Growth and adhesion of *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry are not influenced by norepinephrine

Vivian Lucca<sup>1\*</sup>, Karen A. Borges<sup>1</sup>, Thales Q. Furian<sup>1</sup>, Anderlise Borsoi<sup>2</sup>, Carlos Tadeu P. Salle<sup>1</sup>, Hamilton Luiz S. Moraes<sup>1</sup> e Vladimir P. do Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: +55 51 3308-6130.

[cdpa@ufrgs.br](mailto:cdpa@ufrgs.br)

<sup>2</sup>Universidade Tuiuti do Paraná, R. Sydney Antonio Rangel Santos, 238, Curitiba, PR, Brazil. Phone: +55 41 3331-7617. [anderliseb@yahoo.com.br](mailto:anderliseb@yahoo.com.br)

\*Corresponding author: Avenida Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. Telephone: +55 51 33086138. Fax: +55 51 33086130. E-mail: [viviluka@gmail.com](mailto:viviluka@gmail.com)

## Abstract

*Salmonella* spp. are among the leading pathogens responsible for foodborne illnesses worldwide. Bacterial communities use a quorum sensing (QS) system to control biofilm formation. QS is a cell-to-cell signaling mechanism involving compounds called auto-inducers (AI). Norepinephrine utilizes the same bacterial signaling of AI-3 and serves as a signal of QS. Acid stress is a challenge encountered by microorganisms in food processing environments and in the gastrointestinal tracts of hosts. Thus, adaptation to acidic environments may increase the pathogenicity of the strain. The aim of this study was to evaluate the influence of two concentrations of norepinephrine (100  $\mu$ M and 250  $\mu$ M) and acidification (pH 3.0) of the medium on the growth and adhesion of *Salmonella* Heidelberg strains isolated from poultry sources at 12°C and 25°C. Furthermore, three genes associated with the biofilm formation process were detected (*adrA*, *csgD*, and *sidA*). Stimulation with norepinephrine did not result in a significant increase in bacterial growth or adhesion, regardless of the concentration and temperature. The medium acidification led to lower growth than with other treatments but resulted in significantly higher adhesion. The *adrA* and *sidA* genes showed higher detection frequencies than *csgD*. Thus, stimulation of *S. Heidelberg* strains with norepinephrine does not result in increased growth or greater bacterial adhesion, but acidified medium favored the process of biofilm formation.

Keywords: *Salmonella* Heidelberg, catecholamines, adhesion, growth, media acidification

## INTRODUCTION

Salmonellosis is one of the major foodborne diseases worldwide, including Brazil [8,57]. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimate that *Salmonella* affects approximately 1.2 million people each year, resulting in 23,000 hospitalizations and 450 deaths in the United States alone [12]. In the European Union, it is the second leading cause of foodborne diseases after *Campylobacter* spp. [20]. *Salmonella* spp. infections were responsible for more than 30% of all foodborne disease outbreaks that occurred in Brazil between 2000 and 2017 [8]. Poultry products are the main source of *Salmonella* contamination [13]. Among *Salmonella* serotypes, *Salmonella* Heidelberg has been cited as one of the most frequent in infectious processes in humans [14] and one of the most frequently isolated strains from birds in Brazil in recent years. Its control is considered very difficult [19].

To survive outside the host, *Salmonella* strains are able to adhere to different surfaces and form biofilms [53]. Biofilms are defined as microbial communities formed by cells that adhere to each other and to an inert or living substrate, as well as embedded in a matrix of extracellular polymer substances [18]. The main components of the extracellular matrix are curli fimbriae and cellulose. Curli is related to surface adhesion, cell aggregation, and biofilm production [47]. Cellulose production is associated with adhesion to abiotic surfaces, the increase of resistance, and the capability of cell-cell interaction [48,49]. Even if there is no association between biofilm production and pathogenicity *in vivo* [46], biofilm formation increases the ability of pathogenic bacteria to survive stressor agents that are commonly found in the food processing industry or during host infection [29]. The formation of biofilms in food-producing plants, including poultry slaughterhouses, is a public health problem since food contamination may occur due to the rupture of biofilms and the consequent release of pathogens [17,35].

Communication among microorganisms that compose biofilms is essential during the process of biofilm formation, as it may guarantee access to nutrients and the maintenance of the community. This communication is based on the population density and leads to the emission of substances that generate stimuli and dependent responses in a system known as quorum sensing (QS). QS systems allow the bacteria present in biofilms to capture information from their environment, communicate with other microorganisms, monitor their population density, and regulate their gene expression [52].

These communication systems work by secreting substances called auto-inducers. Auto-inducer 3 (AI-3) is inhibited by adrenergic receptor antagonists. For this reason, it is suggested that it has a structure similar to catecholamines. Thus, the presence of epinephrine or norepinephrine could serve as a sign of QS [54]. Greater

release of hormones such as catecholamines can be triggered by stress caused by overpopulation, nutritional deficiency, inadequate poultry conditions, high ambient temperature, or the presence of pathogens. These catecholamines are activated as part of the process of infectious diseases and increase the expression of virulence factors [40].

The ability of pathogenic bacteria to resist adverse environmental conditions has been identified as a presumptive determinant of their virulence potential through the evaluation of stress tolerance responses [1]. In an attempt to stop the development of microorganisms, the media can be acidified to alter their habitat and create acid stress. This stress mimics the challenges commonly faced by microorganisms in food-processing environments and the gastrointestinal tracts of hosts. To reach the intestine and colonize and invade the intestinal tissues, pathogenic *Salmonella* cells must survive the acidic barrier of the stomach, which makes acid adaptation an important feature for the development of infections [31]. In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of two concentrations of norepinephrine and the acidification of the culture medium on the growth and the adhesion capacity of *S. Heidelberg* strains at 12°C and 25°C. In addition, three genes involved in the biofilm formation process were detected: *sidA*, *csgD*, and *agrA*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains**

A total of 20 strains of *S. Heidelberg* that were isolated from poultry sources in 2017 (Table 1) were selected for this study. A complete antigenic characterization and serovar identification were performed by the Enteric Pathogens Laboratory in the Oswaldo Cruz Institute Foundation (Fiocruz) (Rio de Janeiro, Brazil) and in the Porto Belo Laboratory (Porto Alegre, Brazil). The bacterial isolates were kept frozen at -20°C in brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) and supplemented with 3:1 glycerin (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil).

### **Preparation of culture media and reagents**

Two concentrations of norepinephrine ((±)-norepinephrine (+)-bitartrate, salt, A0937) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) were tested: 100 µM and 250 µM. Previously, a stock solution was prepared at an initial concentration of 5 mM [25], followed by dilution in sterile distilled water and sterilization with a 0.22-µm membrane filter (K18-230) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil). Acidified RPMI and TSB broths (pH 3.0) were obtained by preparing the media according to the manufacturer's recommendations, followed by the

addition of 2 mL and 1 mL of hydrochloric acid (HCl), respectively[38]. The broths were sterilized with a 0.22- $\mu\text{m}$  membrane filter (K18-230) (Kasvi).

### **Evaluation of bacterial growth**

The bacteria were retrieved from frozen culture stocks and cultured overnight at 37°C in BHI. All strains were then transferred to deoxycholate lysine xylose (XLD) (Oxoid) and incubated again at 37°C for 24 hours. For inoculum preparation, three colonies were inoculated into BHI and incubated at 37°C for 3 h to reach a concentration of 10<sup>6</sup> CFU/mL [33]. From this inoculum, a serial dilution was performed up to 10<sup>2</sup> CFU/mL.

For the tests, 1 mL of the inoculum was added to each treatment. The bacterial growth was evaluated in RPMI broth (Sigma-Aldrich) using four treatments: (1) RPMI (control), (2) RPMI + norepinephrine (100  $\mu\text{M}$ ), (3) RPMI + norepinephrine (250  $\mu\text{M}$ ), and (4) acidified RPMI. The solutions were incubated at 37°C for 16 h except for treatment 4, for which the incubation period was 4 h [38]. Next, an aliquot of 200  $\mu\text{L}$  of each treatment was inoculated in triplicate in four sterile 96-well flat-bottomed polystyrene plates (K12-096) (Kasvi). Each treatment was evaluated at two temperatures: 12  $\pm$  1°C to simulate the environment of poultry slaughterhouses [7] and 25  $\pm$  1°C (room temperature). The optical density (OD) of each well was measured at 550 nm in an ELx800 Absorbance Reader (Biotek, Winooski, Vermont, United States). As a positive control, a strain of *Salmonella* Enteritidis from our stock collection was used, and sterile RPMI broth was used as a negative control.

### **Evaluation of bacterial adhesion and biofilm formation capacity**

The bacteria were retrieved from frozen culture stocks and cultured overnight at 37°C in BHI. All strains were then transferred to trypticase soya agar without glucose (TSA) (Oxoid) and incubated again at 37°C for 24 hours. After incubation, the strains were transferred to trypticase soya broth (TSB) (Becton, Dickinson and Company - BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) and incubated again at 37°C for 24 h. To prepare the inoculum, McFarland standard No. 1 (Probac do Brasil, São Paulo, Brazil) was used as a reference to adjust the turbidity of the bacterial suspension in TSB without glucose to a concentration of 3  $\times$  10<sup>8</sup> CFU/mL. The concentration of the obtained inoculum was verified in a spectrophotometer at 620 nm (SP-22) (Biospectro, Curitiba, Paraná, Brazil), and readings were accepted in a range of 0.224 to 0.300.

The bacterial adhesion was evaluated for four treatments: (1) TSB (control), (2) TSB + norepinephrine (100  $\mu\text{M}$ ), (3) TSB + norepinephrine (250  $\mu\text{M}$ ), and (4) acidified TSB. Bacterial adhesion was performed as

described by Borges et al. (2018). After the addition of the inoculum, 4  $\mu\text{L}$  of norepinephrine at 100 mM and 4  $\mu\text{L}$  of norepinephrine at 250 mM were added for each treatment. For treatment 4, acidified TSB was used for the preparation of the inoculum. The plates were incubated for 24 hours at  $12 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . In addition, we included a biofilm producer strain for each temperature. This strain belonged to the serotype of *Salmonella* Enteritidis and was selected from our stock collection. Sterile TSB was used as the negative control.

The optical density of each strain ( $\text{OD}_s$ ) was obtained from the arithmetic mean value of three wells. The strains were classified as described previously [55]. The cut-off OD ( $\text{OD}_c$ ) for the microtiter-plate test was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control. The strains were also classified as non-biofilm producers ( $\text{OD}_s \leq \text{OD}_c$ ) or biofilm producers ( $\text{OD}_s \geq \text{OD}_c$ ).  $\text{OD}_s$  values were used to evaluate the adhesion of each treatment, and the classification into these two categories was used to compare the biofilm production capacity.

### Detection of genes associated with biofilm production

DNA extraction was carried out by heat treatment as described by Borsoi et al. [6]. Individual protocols were conducted to detect the presence of three genes associated with biofilm production: *csgD* (F: TGCGGACTCGGTGCTGTTGT | R: CAGGAACACGTGGTCAGCGG), *adrA* (F: GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT | R: GCCCATCAGCGCGATCCACA), and *sida* (F: AATATCGCTTCGTACCAC | R: GTAGGTAAACGAGGAGCAG). The primer sequences (Ludwig Biotechnology, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) were obtained from previous studies [32,43]. All reaction mixtures (25  $\mu\text{L}$ ) were composed of 2.5  $\mu\text{L}$  of 10x buffer solution, 2  $\mu\text{L}$  of dNTPs (2mM), 1  $\mu\text{L}$  of each primer (25pmol), 1U of Taq Polymerase, 1.5  $\mu\text{L}$  of  $\text{MgCl}_2$ , and 2  $\mu\text{L}$  of DNA. Programs with 30 (*sida*) or 35 (*csgD* and *adrA*) cycles ( $94^\circ\text{C}$  for 30s,  $60^\circ\text{C}$  for 30s,  $72^\circ\text{C}$  for 30s) were performed in a 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, San Mateo, USA). The amplified products (*csgD*: 123 pb; *adrA*: 92 pb; *sida*: 274 pb) were separated by electrophoresis in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Fragments were transilluminated with UV light. *S. enteritidis* ATCC 13076 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 were used as positive controls. In all PCRs, all constituents of the PCR except the extracted DNA were mixed and used as a PCR control.

### Statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarize the data of each treatment according to the absorbance values of the strains. The absorbance averages for different treatments were compared using an analysis of variance (ANOVA), followed by a Bonferroni multiple-comparison test. The software PASW Statistics 18 was used for the statistical analyses with a significance level of 5%.

## RESULTS

Table 2 shows the mean OD and standard deviations for each treatment for the growth evaluation of *S. Heidelberg* at 12°C and 25°C. At 12°C, no significant difference ( $p>0.05$ ) was observed in bacterial growth after stimulation with catecholamines, regardless of the concentration. At 25°C, the treatment with 250 µM of norepinephrine resulted in significantly lower bacterial growth ( $p<0.05$ ) in relation to the lowest concentration and the treatment containing only RPMI (control). Stimulation with acidified culture medium resulted in a lower growth of *S. Heidelberg* in relation to the other treatments, regardless of the temperature. When comparing the influence of temperature within the same treatment, significantly greater bacterial growth ( $p<0.05$ ) was observed at 25°C for both concentrations of norepinephrine and for the RPMI (control) group. However, there was no significant difference ( $p>0.05$ ) between the temperatures for the treatment with the acidified medium.

The mean OD and standard deviations for the adhesion evaluation are shown in Table 3. Regardless of the incubation temperature and norepinephrine concentration, no significant difference ( $p>0.05$ ) was observed in the bacterial adhesion after the stimulation with norepinephrine. However, after the stimulation with acidified TSB, a significantly higher bacterial adhesion ( $p<0.05$ ) was observed at both temperatures. When comparing the influence of temperature in the same treatment, significantly greater bacterial adhesion ( $p<0.05$ ) was observed at 25°C for all analyses except for the treatment with 100 µM of norepinephrine.

Regarding biofilm formation, no strain was classified as a biofilm producer in the control group when the incubation temperature was 12°C. At 25°C, 30% (6/20) of them did produce biofilms. Among groups stimulated with norepinephrine, biofilm formation was observed in a single strain at 25°C at both norepinephrine concentrations. Furthermore, 70% (14/20) of the strains incubated in acidified TSB showed biofilm formation at 12°C, while 30% (6/20) showed biofilm formation at 25°C. The gene profiles associated with biofilm formation are shown in Table 1. The *adrA* gene was detected in all strains, *sidA* was detected in 95% (19/20), and *csgD* was detected in 55% (11/20). All three genes were present simultaneously in 55% (11/20) of the strains.

## DISCUSSION

The influence of stress on the pathogenesis of bacterial diseases has often been associated with mechanisms involving the suppression or depression of the immune response, which is responsible for the occurrence of diseases. However, the ability of enteric pathogens to respond directly to stress-related neurochemical mediators, especially catecholamines, has been demonstrated as a mechanism unrelated to immunity by which stress can influence the infectivity of bacteria [40]. In this context, it is greatly important for public health to evaluate the influence of different concentrations of norepinephrine on the growth and adhesion of pathogenic microorganisms.

To assess the influence of catecholamines on *S. Heidelberg* growth, the strains were challenged with two concentrations of norepinephrine in RPMI broth (100  $\mu$ M and 250  $\mu$ M). RPMI is a broth with low availability of nutrients, including iron, and it is used to mimic the environment found by bacteria in the host [40]. Catecholamines share a similar chemical structure with groups of bacterial siderophores, thus favoring the absorption of iron in nutrient-poor environments, such as the host intestine [36,40].

Differently from our expectations, the stimulation with catecholamines at these concentrations did not influence the bacterial growth of *S. Heidelberg*. No other studies have evaluated the influence of these substances on the growth of this specific serotype. However, previous studies have shown that the administration of catecholamines results in increased growth of several species of Gram-negative bacteria [26,39,42]. There is a relationship between the amount of catecholamine needed to induce growth and the concentration of the bacterial inoculum. The lower the bacterial inoculum, the more responsive the bacterium is to catecholamine [26,40]. The concentration of inoculum used in the present study (10<sup>2</sup> CFU / mL) is considered very low [26]. However, no response was observed after the stimulation with catecholamines.

Previous studies also indicate that norepinephrine has a greater capacity for stimulation in relation to epinephrine [26]. The concentrations of norepinephrine that were used in the present study are consistent with those usually used by other researchers [15,26,42]. Preliminary studies indicated that the use of higher concentrations of norepinephrine (500  $\mu$ M) results in lower bacterial growth at 25°C (data not shown), which may also explain the lowest bacterial growth observed after stimulation with 250  $\mu$ M of norepinephrine.

To evaluate the influence of catecholamines on *S. Heidelberg* adhesion, the strains were stimulated with norepinephrine concentrations of 100  $\mu$ M and 250  $\mu$ M in TSB broth. The methodology used was efficient to evaluate the bacterial adhesion of the strains. The use of TSB broth without glucose was based on the fact that it is a nutrient-poor culture medium, which favors bacterial adhesion [45]. The polystyrene microplates mimic some of the materials used in the food industry and farm structures [44]. Studies have shown that

norepinephrine increases the adhesion of pathogenic microorganisms to biotic [3,22] and abiotic surfaces [34,50]. However, in the present study, no significant differences were found in the adhesion and biofilm formation capacity of the strains after norepinephrine stimulation, regardless of the incubation temperature and catecholamine concentration.

A similar study performed by Hiller et al. [34] detected higher biofilm formation capacity after stimulation with the highest concentration (100  $\mu$ M) of norepinephrine when the incubation temperature was 12°C. However, the study analyzed only *S. Enteritidis* strains, and the differences found may have been related to the serotype's intrinsic characteristics. Borges et al. [5] demonstrated that serotypes may partially influence biofilm production. Thus, the difference in the serotypes evaluated could explain the variations found between the two studies.

Enteric pathogens are exposed to several stressful conditions during their life cycle in the host, including the acidic pH of the stomach, the activity of bile salts, reduced oxygen concentration, and competing microbial flora [22]. It has been demonstrated that *S. Enteritidis* strains present higher resistance to low pH when subjected to an acidic and cold environment during processing, which increases their capacity to survive the gastric barrier in humans [51]. Acid tolerance is a phenotypic response that refers to increased resistance to extreme pH conditions after adaptation to environments with sublethal acidity [23,30,37]. Bacteria exposure to mildly acidic or alkaline conditions may confer increased resistance to lethal conditions and thus result in an increased risk of foodborne diseases due to increased pathogenicity of the microorganism [58].

According to Foster [24], *S. Typhimurium* has the ability to survive at extremely low pH (pH 3.0 to 4.0) if it is first subjected to pH conditions ranging from moderate to nearly neutral (pH 5.5 to 6.0). A possible mechanism for acid resistance is the regulation of the lipid composition of the cell membrane in response to the change in pH in order to maintain a suitable liquid-crystalline balance. These changes in the proportion of saturated, unsaturated, and cyclic fatty acids can affect the fluidity of the bacterial membrane, which allows protons to flow more quickly in or out of the cells to maintain pH homeostasis [60]. Therefore, in addition to the stimulation with catecholamines, growth and bacterial adhesion were also evaluated under stress conditions in acidified medium (pH 3.0).

Significantly lower growth of *S. Heidelberg* was observed in the treatment with acidified medium, regardless of the incubation temperature. Since the strains evaluated were not pre-exposed to sublethal acid conditions, this result was expected since it is known that acidic conditions tend to reduce growth or even cause bacterial death [56]. On the other hand, *S. Heidelberg* adhesion was significantly higher in the group treated

with acidified medium, regardless of the incubation temperature. The use of acidified medium resulted in 70% of the strains forming biofilms at 12°C and 30% at 25°C. Previous studies present conflicting data on the influence of acidic pH of the medium on the biofilm formation capacity. Experimental assays with *S. Typhimurium* and *Lactobacillus rhamnosus* suggest that low pH conditions decrease the rate of biofilm formation due to interference in the binding and initial adhesion of the bacteria to the surface [21,41]. In contrast, Costa et al. [16] observed high adhesion capacity under acidic pH conditions, demonstrating that stress conditions for bacterial cells tend to favor higher biofilm formation.

The incubation temperature is one of the factors that can interfere in the growth and adhesion of *S. Heidelberg* strains. Temperature positively influenced the growth and adhesion of catecholamine-stimulated strains except for adhesion in the treatment with 100 µM of norepinephrine. These results are possibly due to the fact that *Salmonella* growth is higher at temperatures closer to the ideal range (35 to 37°C), whereas at lower temperatures, the growth is slower or reduced [56]. Previous studies have already demonstrated the strong influence of temperature on adhesion and biofilm formation [5,10,43]. The temperature of cut rooms in poultry slaughterhouses should be 12°C at most [7], which is far from the ideal range for growth. However, even under unfavorable thermal conditions, the strains of *S. Heidelberg* were not only able to grow but also to adhere to the surfaces. Although adhesion is not sufficient to form biofilms, it is important to note that monospecies biofilms, such as those evaluated *in vitro*, are rare in food-handling environments.

The interaction among microorganisms of a multispecies biofilms may interfere with the adhesion capacity of different bacterial species [9,11]. In addition, cut rooms have favorable microenvironments for the adhesion of *Salmonella* due to the deposition of carcass residues and the grooves that form in the cutting plates [61]. The temperature of 25°C is found in consumer residences and in many environments where food is handled. In the present study, biofilm producer strains were found at this temperature. The biofilm formation by *Salmonella* spp. is a major concern for the food industry due to the permanence of bacteria on the surfaces, which poses a constant risk of contamination of the final product [61].

The regulation of biofilm formation by *Salmonella* spp. strains is a very complex process and depends on the activation and expression of several genes. These genes are especially related to curli fimbriae and cellulose expression. The *csgD* gene is the main transcriptional regulator of the *csgBAC-csgDEFG* complex and is responsible for controlling and promoting the formation of *Salmonella* biofilms due to the regulation of the expression of extracellular matrix substances, including curli fimbriae [28]. Fimbriae are important structures for biofilm formation process since they promote the initial adhesion on the cell surface [2].

The *adrA* gene is responsible for the activation of cellulose production at the post-transcriptional level via direct interaction with one or more genes encoded by the *bcsABZC-bcsEFG* operon through interaction with other genes [47,53]. The *sdia* gene does not regulate secretory systems associated with *Salmonella* virulence, but it does regulate secondary factors that may contribute to intestinal survival [32]. In the present study, we detected a high frequency of *adrA* and *sdia*, but the frequency was less than 60% for *csgD*. Yin et al. [59] detected a frequency greater than 75% for the three genes in *Salmonella* strains. Hiller et al. [34] found *adrA* and *csgD* in all *S. Enteritidis* strains. Halasti et al. [32] detected *sdia* in all strains belonging to 155 serotypes of *Salmonella*.

One of the possibilities for the difference of the *csgD* results is the influence of serotype, since some genes present serotypespecificity [4]. Freestone et al. [27] also reported that the profiles of the genes regulated by the catecholamines norepinephrine and epinephrine are different from each other. Further studies on the molecular mechanisms of biofilm formation are necessary to understand the complex production of these structures.

Norepinephrine stimulation did not influence the growth or adhesion of *Salmonella* Heidelberg strains, regardless of the catecholamine concentration and temperature. On the other hand, the use of acidified medium (pH 3.0) resulted in a significant reduction of growth and a significant increase of *S. Heidelberg* adhesion at both temperatures, indicating that the acidified medium favors the biofilm formation process. Experiments analyzing the biofilm production process by *S. Heidelberg* strains are not common, and further studies are necessary to understand this complex process.

**Acknowledgements:** The authors are grateful to the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship provided to Vivian Lucca.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that there is no conflict of interest.

**REFERENCES**

1. Alvarez-Ordóñez A, Broussolle V, Colin P, Nguyen C, Pietro M (2015) The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. *Int J Food Microbiol.* 213: 99-109. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004.
2. Barnhart MM, Chapman MR (2006) Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol.* 60:131–147. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142106
3. Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A (2007) Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun.* 75:4597-4607.
4. Borges KA, Furian TQ, Souza SN, Salle, CTP, Moraes, HLS, Pinheiro VP (2019) Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from poultry sources in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science. Braz J Poult Sci.* 21:1-8. Doi:10.1590/1806-9061-2018-0827
5. Borges KA, Furian KA, Souza SN, Menezes R, Tondo EC, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP (2018) Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. *Pesq Vet Bras.* 38:71-76. Doi:10.1590/1678-5150-pvb-4928
6. Borsoi A, Santin E, Santos LR, Salle CT, Moraes HL, Nascimento VP (2009) Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. *PoultSci* 88:750-758. doi: 10.3382/ps.2008-00466.
7. Brasil (1998) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 210. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de carne de Aves. Diário Oficial [Da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 November 1998.
8. Brasil (2018) Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf> Accessed 09 January 2019
9. Burmolle M, Ren D, Bjarnsholt T, Sorensen SJ (2014) Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 22:84-91. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.004

10. Cabarkapa I, Škrinjar M, Lević J, Kokić B, Blagojev N, Milanov D, Suvajdžić L (2015) Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. Acta Vet-Beograd. 65:371-389. Doi:10.1515/acve-2015-0031
11. Carvalho D (2019) Formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*: Aplicação de modelagem preditiva e alternativas para controle. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
12. CDC (Center for Disease Control) (2011a) CDC 2011 estimates: findings. CDC. <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html> Accessed 16 January 19
13. CDC (Center for Disease Control) (2011b) Making food safer to eat: reducing contamination from the farm to the table. CDC. <http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/> Accessed 12 March 19
14. Chittick P, Sulka A, Tauxe RV, Fry AM (2006) Summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. J Food Prot 69:1150-1153.
15. Conceição RCS, Sturbelle RT, Timm CD, Leite FPL (2015) Inducers and autoinducers on *Salmonella entericaserovar* Typhimurium motility, growth and gene expression. Cienc Rural 45: 2201-2206. Doi:10.1590/0103-8478cr20150295
16. Costa JCM, Espeschit IF, Pieri FA, Benjamin LA, Moreira MAS (2014) Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. Cienc Rural 44:666-671. doi:10.1590/S0103-84782014000400015
17. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol.49:711-745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
18. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 15:167–193.
19. Duarte SC (2018) Epidemiologia dos principais sorotipos de *Salmonella* circulantes na avicultura brasileira. In: Simpósio – *Salmonella*: cenários e desafios. Porto Alegre, Brazil. 29 November 2018.
20. EFSA (European Food Safety Authority) (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal. 15: 1–228.

21. Emanuel V, Adrian V, Diana P (2010) Microbial biofilm formation under the influence of various physical-chemical factors. *BiotechnolBiotechnol Equip.* 24:1993-1996. DOI: 10.2478/V10133-010-0056-9
22. Everest P (2007) Stress and bacteria: microbial endocrinology. *Gut.* 56:1037-1038.
23. Foster JW, Hall HK (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol.* 172:771-778.
24. Foster JW (1991) *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J Bacteriol.* 173: 6896–6902.
25. Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M (1999) Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol Lett.* 172:53-60. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13449.x
26. Freestone PP, Haigh RD, Lyte M (2007) Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett.* 269:221-228. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00619.x
27. Freestone PP, Sandrini SM, Haigh RD, Lyte M (2008) Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends Microbiol.* 16:55-64. doi: 10.1016/j.tim.2007.11.005
28. Gerstel U, Römling U (2003) The *csqD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Res Microbiol.* 154:659-67. DOI: 10.1016/j.resmic.2003.08.005
29. Giaouris E, Samoilis G, Chorianopoulos N, Ercolini D, Nychas GJ (2013) Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. *Int J Food Microbiol* 162:105-113. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.023
30. Goodson M, Rowbury RJ (1989) Resistance of acid-habituated *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. *Lett App Microbiol* 8:211-214. Doi: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00250.x
31. Gravani RB (1992) Salmonellosis – *Salmonella* food poisoning. *Dairy Food Sanit* 4: 227, 1992.
32. Halatsi K, Oikonomou I, Lambiri M, Mandilara G, Vatopoulos A, Kyriacou A. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. *FEMS Microbiol Lett.* 259:201-207. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00266.x
33. Hiller C (2017) Influência das catecolaminas norepinefrina e epinefrina na formação de biofilme em isolados de *Salmonella* Enteritidis. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

34. Hiller CC, Lucca V, Carvalho D, Borsoi A, Borges KA, Furian TQ, do Nascimento VP (2019) Influence of catecholamines on biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis. *MicrobPathog.* 130:54-58. doi: 10.1016/j.micpath.2019.02.032.
35. Hung CS, Henderson JP (2009) Emerging concepts of biofilms in infectious diseases. *Mo Med* 106:292-296.
36. Kinney KS, Austin CE, Morton DS, Sonnenfeld G (2000) Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacterial – mechanistic studies. *Life Sci.* 67:3075-3085.
37. Koutsoumanis KP, Sofos JN (2004) Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Lett ApplMicrobiol.* 38: 321-326.
38. Lianou A, Hychas GJE, Koutsoumanis KP (2017) Variability in the adaptive acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains. *Food Microbiol.* 62:99-105. DOI: 10.1016/j.fm.2016.10.011
39. Lyte M, Ernst S (1992) Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci.* 50:203-12.
40. Lyte M, Vulchanova L, Brown DR (2011) Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell Tissue Res.* 343:23–32. doi: 10.1007/s00441-010-1050-0.
41. Nguyen HDN, Yang YS, Yuk HG (2014) Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT Food Sci Technol.* 55:383-388. Doi:10.1016/j.lwt.2013.09.022
42. O'Donnell PM, Aviles H, Lyte M, Sonnenfeld G (2006) Enhancement of in vitro growth of pathogenic bacteria by norepinephrine: importance of inoculum density and role of transferrin. *Appl Environ Microbiol.* 72:5097-5099. doi: 10.1128/AEM.00075-06
43. Oliveira DC, Fernandes Júnior A, Kaneno R, Silva MG, Araújo Júnior JP, Silva NC, Rall VL (2014) Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathog Dis.* 1:478-483. doi:10.1089/fpd.2013.1710.
44. Piras F, Fois F, Consolati SG, Mazza R, Mazzette R (2015) Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. *J Food Prot.* 78:1875-1878. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-085
45. Rodrigues LB, dos Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, de Oliveira AP, Trenhago G, Rodegheri SC, Taglieti RM, Dickel EL, do Nascimento VP (2009) Avaliação da hidrofobicidade e da formação de

- biofilmes em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. ActaSci Vet. 37: 225-230.
46. Rodrigues SV, Laviniki V, Borges KA, Furian TQ, Moraes HLS, Nascimento VP, Salle CTP (2019) Biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli* is not related to in vivo pathogenicity. CurrMicrobiol 76:194–199.
  47. Römling U (2005) Characterization of the rdarmorphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. Cell Mol Life Sci 62: 1234-1246. doi: 10.1007/s00018-005-4557-x
  48. Römling U (2007) Cellulose Biosynthesis in *Enterobacteriaceae*. In: Brown Jr. RM, Saxena IM (ed) Cellulose: Molecular and Structural Biology, 1st edn. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 107-122.
  49. Römling U, Rohde M, Olsén A, Normark S, Reinköster J (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. MolMicrobiol 36:10-23.
  50. Sandrini S, Alghofaili F, Freestone PI, Yesilkaya H (2014) Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. BMC Microbiol. 14:1-12. doi: 10.1186/1471-2180-14-180.
  51. Silva SQ, dos Santos MT, Paes AS, Vanetti MCD (2016) Acid and low temperature treatments on *Salmonella* Enteritidis inoculated in pork and its subsequent survival in simulated gastric fluid. Cienc Rural. 46:530-535. Doi:10.1590/0103-8478cr20141582
  52. Sola MC, Oliveira AP, Feistel JC, Rezende CSM (2012) Mecanismos de *quorum sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. Enc Biosf 8:1419-1441.
  53. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, de Keersmaecker SCJ (2012) *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Res Int 45:502-531 doi:10.1016/j.foodres.2011.01.038
  54. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. Proc Natl AcadSci USA 100:8951-8956. Doi:10.1073/pnas.1537100100
  55. Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Lett ApplMicrobiol 38:428-432. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x
  56. Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2017) Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 935p.

57. WHO (World Health Organization) (2018) *Salmonella*.  
[https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/salmonella/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/) Accessed 05 January 2019.
58. Yang Y, Kadim MI, Khoo WJ, Zheng Q, Setyawati MI, Shin YJ, Lee SC, Yuk HG (2014) Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *Int J Food Microbiol.* 191: 24–31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.034.
59. Yin B, Zhu L, Zhang Y, Dong P, Mao Y, Liang R, Niu L, Luo X (2018) The characterization of biofilm formation and detection of biofilm-related genes in *Salmonella* isolated from beef processing plants. *Foodborne Pathog Dis.* 15:1-8. doi: 10.1089/fpd.2018.2466
60. Yuk HG, Marshall DL (2004) Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Appl Environ Microbiol.* 70:3500-3505. DOI: 10.1128/AEM.70.6.3500-3505.2004
61. Ziech RE, Lampugnani C, Perin AP, Viana C, Rall VLM, Bersot LS (2014) Formação de biofilmes por *Salmonella* spp. isoladas de esteiras condutoras de frango em salas de cortes de plantas processadoras de aves. In: Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene. Blucher Food Science Proceedings, São Paulo 2014. DOI: 10.5151/foodsci-microal-108

Table 1 - Identification, year and source of isolation, and molecular profile of Salmonella Heidelberg strains.

Identification	Year of Isolation	Source of Isolation	Molecular profile
01	2017	Feces	<i>adrA, sidA, csgD</i>
02	2017	Drag swab	<i>adrA e csgD</i>
03	2017	Feces	<i>adrA, sidA, csgD</i>
04	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA, csgD</i>
05	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA, csgD</i>
06	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA, csgD</i>
07	2017	Feces	<i>adrA, sidA, csgD</i>
08	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA, csgD</i>
09	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA</i>
10	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA, csgD</i>
11	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA</i>
12	2017	Feces	<i>adrA, sidA, csgD</i>
13	2017	Feces	<i>adrA, sidA</i>
14	2017	Feces	<i>adrA, sidA</i>
15	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA</i>
16	2017	Feces	<i>adrA, sidA</i>
17	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA</i>
18	2017	Feces	<i>adrA, sidA</i>
19	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA, csgD</i>
20	2017	Drag swab	<i>adrA, sidA, csgD</i>

Table 2 - Optical density means for growth evaluation of *Salmonella* Heidelberg strains submitted to different treatments and incubated at 12 °C and 25 °C.

Group	Means $\pm$ standard-deviation (12 °C)	Means $\pm$ standard-deviation (25 °C)
RPMI (control)	0.181230 $\pm$ 0.092545 <sup>a,A</sup>	0.44871 $\pm$ 0.4287 <sup>a,B</sup>
NOR 100 $\mu$ M	0.181438 $\pm$ 0.108368 <sup>a,A</sup>	0.44356 $\pm$ 0.004394 <sup>a,B</sup>
NOR 250 $\mu$ M	0.182035 $\pm$ 0.112326 <sup>a,A</sup>	0.43143 $\pm$ 0.04789 <sup>b,B</sup>
Acidified RPMI	0.070310 $\pm$ 0.027227 <sup>b,A</sup>	0.07295 $\pm$ 0.03401 <sup>c,A</sup>

Legend: Norepinephrine (NOR).

Different lowercase letters in the same column indicate that there is statistical difference ( $p < 0.05$ ) between treatments, within the same temperature.

Different capital letters on the same line indicate that there is statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the temperatures, within the same treatment.

Table 3 - Optical density means for adhesion evaluation of *Salmonella* Heidelberg strains submitted to different treatments and incubated at 12 °C and 25 °C.

Group	Means $\pm$ standard-deviation (12 °C)	Means $\pm$ standard-deviation (25 °C)
TSB (control)	0.15855 $\pm$ 0.003566 <sup>a,A</sup>	0.17810 $\pm$ 0.07931 <sup>a,B</sup>
NOR 100 $\mu$ M	0.15380 $\pm$ 0.004864 <sup>a,A</sup>	0.17535 $\pm$ 0.009967 <sup>a,A</sup>
NOR 250 $\mu$ M	0.15275 $\pm$ 0.004613 <sup>a,A</sup>	0.17835 $\pm$ 0.10881 <sup>a,B</sup>
Acidified TSB	0.19600 $\pm$ 0.07029 <sup>b,A</sup>	0.28125 $\pm$ 0.11235 <sup>b,B</sup>

Legend: Norepinephrine (NOR).

Different lowercase letters in the same column indicate that there is statistical difference ( $p < 0.05$ ) between treatments, within the same temperature.

Different capital letters on the same line indicate that there is statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the temperatures, within the same treatment.