

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS POR BACTÉRIAS
PSICOTRÓFICAS ISOLADAS DE RESFRIADORES DE EXPANSÃO PARA LEITE

Juliana Flach

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
JANEIRO, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS POR BACTÉRIAS
PSICOTRÓFICAS ISOLADAS DE RESFRIADORES DE EXPANSÃO PARA LEITE

Juliana Flach
Bióloga (UFRGS)
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS)

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente na área de Microbiologia Agrícola

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
JANEIRO, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Flach, Juliana
CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS
POR BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS ISOLADAS DE RESFRIADORES
DE EXPANSÃO PARA LEITE / Juliana Flach. -- 2015.
117 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.
Coorientadora: Geciane Toniazzo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Biofilmes Microbianos. 2. Óleos essenciais. 3.
Sanificantes. I. Corção, Gertrudes, orient. II.
Toniazzo, Geciane, coorient. III. Título.

À Imelda e ao José Inácio, pelos exemplos de vida e pelo estímulo à educação dos filhos. Ao Marcos, pelo amor, companheirismo e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Gertrudes e a minha co-orientadora, professora Geciane, por seu apoio, amizade, ensinamentos, incentivos e exemplos. Professora Gertrudes, minha orientadora desde o primeiro semestre da graduação, obrigada também por acreditar em meu potencial e por apresentar-me a essa fascinante área do conhecimento que é a Microbiologia.

A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concretizado.

CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS POR BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE RESFRIADORES DE EXPANSÃO PARA LEITE

Autora: Juliana Flach

Orientadora: Prof. Dr. Gertrudes Corção

Co-orientadora: Prof. Dr. Geciane Toniazzo

¹RESUMO

Biofilmes nos resfriadores de leite representam uma fonte perene de contaminação e um entrave à qualidade dos produtos lácteos. Esta pesquisa propôs-se a isolar e caracterizar microrganismos provenientes de resfriadores de leite cru de propriedades rurais, estudando também a formação e o controle de biofilmes formados *in vitro*. Isolados de *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus* e oriundos de colônias não identificadas foram caracterizados quanto à produção de enzimas e formação de biofilme *in vitro*. Após, foi selecionado um isolado de *Pseudomonas* sp. para estudo da formação e do controle de biofilmes, na presença de óleos essenciais, furanona e sanificantes. Contagens microbianas realizadas indicam a presença de biofilmes nos resfriadores. Dos 297 isolados obtidos, 62,9% produziram proteases, 55,8% produziram lipases e 50,1% formaram biofilmes *in vitro*, destacando o potencial dos biofilmes para a contaminação microbiana e também enzimática do leite cru. A combinação de ácido peracético com óleos essenciais de orégano e alecrim, embora promissora para trabalhos futuros, não potencializou a ação do sanificante, mesmo após três dias consecutivos de tratamento sobre biofilmes já estabelecidos. A formação de biofilmes pela cepa na presença dos óleos essenciais de alecrim, orégano, mandarina verde, mandarina vermelha, laranja e tangerina demonstrou que somente o primeiro reduziu o biofilme formado, talvez com interferência no *quorum sensing* da cepa. A presença de 2(5H)-furanona favoreceu a formação de biofilme pela cepa. Este trabalho contribui com estratégias inovadoras para o controle de biofilmes, cuja aplicação pode resultar no desenvolvimento de produtos mais eficazes no controle microbiológico, além de menos poluentes.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (105 p.) Janeiro, 2015.

CHARACTERIZATION AND CONTROL OF BIOFILMS FORMED BY
PSYCHROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM EXPANSION MILK COOLING
TANKS

Author: Juliana Flach

Advisor: Prof. Dr. Gertrudes Corção

Co-advisor: Prof. Dr. Geциane Toniazzo

²ABSTRACT

Biofilms in milk cooling tanks represent a perennial source of contamination and an obstacle to the dairy products quality. This research has proposed to isolate and characterize microorganisms from raw milk cooling tanks in farms, also studying the formation and control of biofilms formed in vitro. Isolates of *Pseudomonas* spp., *Bacillus cereus* and non-identified colonies were characterized for enzyme production and biofilm formation in vitro. After, the formation and control of biofilms with essential oils, furanone and sanitizers was studied for a selected isolate of *Pseudomonas* sp. Microbial counts indicate the presence of biofilms in the coolers. Of the 297 isolates obtained, 62.9% produced proteases, 55.8% produced lipases and 50.1% formed biofilms in vitro, highlighting the potential of biofilms for microbial and also enzymatic contamination of the raw milk. The combination of peracetic acid with essential oils of oregano and rosemary, although promising for further work, did not potentiate the action of sanitizing, even after three consecutive days of treatment on established biofilms. The biofilm formation by the selected strain in the presence of essential oils of rosemary, oregano, green mandarine, red mandarine, orange and tangerine showed that only the first oil reduced the biofilm, perhaps with interference in the quorum sensing of the strain. The presence of 2(5H)-furanone promoted biofilm formation of the strain. This work has contributed to innovative strategies for controlling biofilms, whose application can result in the development of more effective and less polluting microbiological control products.

² Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (105 p.) January, 2015.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	ix
RELAÇÃO DE FIGURAS	x
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Conceito, formação e tolerância de biofilmes.....	5
2.2. Relevância dos biofilmes para a indústria de alimentos.....	8
2.3. Microrganismos psicrotróficos e a indústria de laticínios	9
2.4. <i>Quorum sensing</i> em biofilmes.....	10
2.5. Controle da formação de biofilmes.....	13
2.5.1. Óleos essenciais.....	16
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	19
3.1. Artigo 1: Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks.....	19
3.2. Artigo 2: Ação individual e combinada de sanificantes e óleos essenciais sobre células planctônicas e biofilmes de <i>Pseudomonas</i> sp. isolada de tanque para resfriamento de leite.	41
3.3. Artigo 3: Atuação de óleos essenciais e 2(5H)-furanona na formação de biofilmes por <i>Pseudomonas</i> sp.	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL	88
5. CONCLUSÕES	97
6. REFERÊNCIAS.....	99
7. APÊNDICES	104
7.1. Resumo de artigo elaborado em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI Campus Erechim, a ser submetido para o periódico <i>Enzyme and Microbial Technology</i>	105

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1 – artigo 1: Mesophiles and psychrotrophic counts inside the milk cooling tanks (CFU/cm ²) in the seven farms analyzed. The collections were made after farmers routine cleaning of the equipments.	29
Tabela 2 – artigo 1: Source of non-typical colonies and <i>Bacillus cereus</i> isolates, their enzyme production and biofilm formation.	30
Tabela 3 – artigo 1: Source of <i>Pseudomonas</i> spp. isolates, their enzyme production and biofilm formation.	30
Tabela 1 – artigo 2: Concentrações de sanificantes e óleos essenciais testadas. Todos foram diluídos em caldo LB suplementado com 0,5% de tween 20 (adaptado de Adukwu et al. 2012).	50
Tabela 2 – artigo 2: Valores de CIM e MBC _p para os sanificantes e óleos essenciais testados frente a células de <i>Pseudomonas</i> sp. na forma planctônica.	52
Tabela 3 – artigo 2: Valores de MBEC e MBC _b determinados para cada um dos três dias consecutivos de tratamento.	52
Tabela 1 – artigo 3: Concentrações testadas dos óleos essenciais e 2(5H)-furanona, bem como a concentração de tween 20 correspondente.	70

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1 – artigo 2: Percentual de remoção do biofilme de *Pseudomonas* sp. após o tratamento (10 min) com ácido peracético (concentrações de 4% a 0,10%) isoladamente ou combinado com óleo essencial de alecrim (1 µL/mL) e orégano (0,125 µL/mL) durante três dias consecutivos. Após cada tratamento diário, o biofilme foi lavado duas vezes com solução salina, coberto com LB estéril, sonificado e a microplaca re-incubada por 24h. A concentração de $\leq 0,5\%$ correspondeu à MBEC e à MBC_b para todos os tratamentos/dias. Dados baseados na DO do meio de cultura após incubação.54

Figura 2 – artigo 2: Quantificação por densidade ótica do biofilme remanescente nas cavidades após o terceiro dia consecutivo de tratamento com ácido peracético isoladamente ou em combinação com óleos essenciais de alecrim e orégano. Após a determinação da MBEC ($\leq 0,5\%$ para todas as combinações), as cavidades foram lavadas duas vezes com solução salina, fixadas com metanol, coradas com solução de cristal violeta (2%) ressolubilizado em ácido acético. As linhas horizontais representam os pontos de corte para a categorização do biofilme remanescente. Cavidades com valores de DO acima do ponto de corte para “biofilme moderado” foram classificadas como “biofilme remanescente em grande quantidade”.55

Figura 3 – artigo 2: Quantificação por densidade ótica do biofilme remanescente nas cavidades após o terceiro dia consecutivo de tratamento com óleo essencial de alecrim e orégano, isoladamente. Após a determinação da MBEC ($\leq 16\mu\text{L/mL}$ para orégano e $>16\mu\text{L/mL}$ para alecrim), as cavidades foram lavadas duas vezes com solução salina, fixadas com metanol, coradas com solução de cristal violeta (2%) ressolubilizado em ácido acético. As linhas horizontais representam os pontos de corte para a categorização do biofilme remanescente. Cavidades com valores de DO acima do ponto de corte para “biofilme moderado” foram classificadas como “biofilme remanescente em grande quantidade”.55

Figura 4 - artigo 2: Observação em microscopia confocal do biofilme de 24h tratado com sanificantes a 4% por 10 min em 30°C. A: ácido peracético diluído em LB com 0,5% de tween 20; B: ácido peracético diluído em LB sem tween; C: ácido peracético diluído em solução salina (NaCl 0,9%); D: hipoclorito de sódio diluído em LB com 0,5% de tween 20; E: biofilme não submetido ao tratamento (controle).56

Figura 1 – artigo 3: Quantificação com cristal violeta do biofilme de *Pseudomonas* sp. formado na presença de diferentes óleos essenciais após 24h de incubação estática em 30°C. Os controles sem tween (caldo LB) e com tween (tween 20 em concentrações idênticas à acrescentadas aos óleos) também são apresentados. As linhas horizontais representam os limites para a categorização do biofilme em “ausente”, “reduzido” ou “moderado” e foram estabelecidas a partir da DO do controle de esterilidade. DOs acima do limite

de “biofilme moderado” são consideradas como “biofilme em grande quantidade”. Mand VD: mandarina verde; mand VM: mandarina vermelha.

.....74

Figura 2 – artigo 3: Quantificação com cristal violeta do biofilme de *Pseudomonas* sp. formado na presença de 2(5H)-furanona após 24h de incubação estática em 30°C. Os controles sem tween (caldo LB) e com tween (caldo LB com tween 20 em concentrações idênticas às acrescentadas à furanona) também são apresentados. As linhas horizontais representam os limites para a categorização do biofilme em “ausente”, “reduzido” ou “moderado” e foram estabelecidas a partir da DO do controle de esterilidade. DOs acima do limite de “biofilme moderado” são consideradas como “biofilme em grande quantidade”.76

Figura 3 – artigo 3: Observação em microscopia confocal das principais condições de teste de óleo de alecrim e de 2(5H)-furanona. A-C: biofilmes controle formados por 24h em caldo LB suplementado com tween 20 nas concentrações de 0,0625%, 0,0078% e 0,0039%, respectivamente. D-F: óleo de alecrim nas concentrações de 4 µL/mL (CIM), 0,5 µL/mL e 0,25 µL/mL, respectivamente (a concentração de tween corresponde, respectivamente a 0,0625%, 0,0078% e 0,0039%). G: biofilme controle formado por 24h em caldo LB sem tween. H-I: 2(5H)-furanona nas concentrações de, respectivamente, 0,06% (CIM) e 0,03% (a concentração de tween corresponde, respectivamente a 0,0078% e 0,0039%).77

Figura 1 - resultados e discussão geral: Microscopia confocal da formação do biofilme de *Pseudomonas* sp. em placas de poliestireno, após 2h (A), 8h (B), 18h (C) e 24h (D) de incubação estática em caldo LB. Coloração: laranja de acridina (0,1%) (Porto Alegre, 2014).92

Figura 2 - resultados e discussão geral: Imagens em microscopia de contraste de fase de biofilmes formados por *Pseudomonas* sp. após um dia (primeira coluna) e após três dias (segunda coluna) de tratamento consecutivo com: caldo LB suplementado com tween 20 - controle (A, B); óleo de orégano combinado com ácido peracético (C, D); óleo de orégano isoladamente (E, F); óleo de alecrim combinado com ácido peracético (G, H); óleo de alecrim isoladamente (I, J). As setas indicam locais em que é possível visualizar o fundo da microplaca. O ácido peracético foi diluído a 4% em caldo LB suplementado com tween 20. Os óleos essenciais de orégano e alecrim foram testados nas concentrações sub-inibitórias de 0,125 µL/mL e 1 µL/mL, respectivamente. Coloração: violeta genciana (2%), visualizações (OLYMPUS BX51) em aumento de 400x (Porto Alegre, 2014).94

1. RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: percentual
®: marca registrada
±: mais ou menos
(-): negativo
(+): positivo
µL: microlitro
°C: graus Celsius
AHL: N-acil-homoserina lactona
AI-2: sistema auto indutor 2
ANOVA: Análise de Variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA: *American Public Health Association*
ATCC: *American Type Culture Collection*
cm: centímetro
cm²: centímetro quadrado
DO: densidade óptica
EPS: Substâncias Poliméricas Extracelulares
FDA: *Food and Drug Administration*
g/L: grama por litro
g/mL: grama por mililitro
GRAS: *Generally Recognized as Safe*
kHz: quilohertz
LB: caldo Luria-Bertani
LBA: ágar Luria-Bertani
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBC_b: Concentração Bactericida Mínima para Biofilmes
MBC_p: Concentração Bactericida Mínima para Células Planctônicas
MBEC: Concentração Mínima para Erradicação de Biofilmes
MIC / CIM: Concentração Inibitória Mínima
Min.: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCA: Ágar padrão para contagem
QS: *quorum sensing*
TSA: ágar triptona de soja
TSB: caldo triptona de soja
UFC: unidade formadora de colônia
UFC/cm²: unidade formadora de colônia por centímetro quadrado
UFC/mL: unidade formadora de colônia por mililitro

1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos sofre uma forte pressão por parte da sociedade para oferecer produtos seguros e que tenham também qualidades nutricional e sensorial. Órgãos governamentais federais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que juntamente com os Estados e Municípios normatizam e fiscalizam a produção de alimentos no país, contribuem para estabelecer padrões de qualidade rígidos e necessários a esse segmento industrial.

Com a globalização e a criação de blocos econômicos, é cada vez maior o número de empresas interessadas em expandir as fronteiras de comercialização de seus produtos, incluindo a indústria de alimentos. Nesse caso, além das exigências da legislação nacional, a indústria deve submeter-se também aos padrões impostos pelo país importador e seu público consumidor, o que muitas vezes implica em elevar ainda mais os níveis de qualidade e investir na modernização dos equipamentos.

Nesse contexto, os já tradicionais problemas enfrentados pelas indústrias de alimentos têm sua importância reforçada. Dentre eles, destaca-se a dificuldade de higienizar adequadamente as superfícies que entram em contato com os alimentos, pela presença de locais de difícil acesso, materiais

que favorecem a adesão de microrganismos e pelo treinamento inadequado dos profissionais envolvidos no processo.

Operações de higienização realizadas de forma inadequada, o *design* inadequado de equipamentos e utensílios e a escolha equivocada dos materiais para sua confecção permitem a adesão e a sobrevivência de microrganismos às superfícies, culminando com a formação de biofilmes. Microrganismos crescendo em biofilmes tornam-se de 10 a 1000 vezes mais tolerantes ao processo de higienização, tendo-se como resultado a contaminação dos alimentos na linha de processamento por patógenos e deterioradores.

Nesse sentido, falhas nos procedimentos de higienização resultantes da formação de biofilmes provocam não apenas o comprometimento da segurança dos alimentos. Perdas de caráter econômico decorrentes da redução da vida útil dos alimentos, dificuldades impostas ao seu processamento e a desqualificação da indústria perante o público consumidor são algumas das principais consequências da presença de biofilmes.

O leite permite o rápido crescimento dos microrganismos. Para minimizar problemas de contaminação, recomenda-se mantê-lo resfriado a 4°C ainda na propriedade rural, o que acarreta na elevação das contagens de microrganismos psicrotóxicos, muitos deles conhecidamente patogênicos e produtores de enzimas termorresistentes.

Na cadeia produtiva do leite os maiores entraves higiênico-sanitários encontram-se na propriedade rural, devido, dentre outros fatores, às precárias condições higiênicas no momento da ordenha, à má qualidade da água de

abastecimento e à falta de orientação adequada para a higienização dos resfriadores e equipamentos para ordenha mecânica. Todos esses fatores contribuem para a formação de biofilmes nos equipamentos disponíveis nas propriedades rurais, cujo controle é um antigo desafio enfrentado pela indústria de laticínios. Curiosamente, há relativamente poucos trabalhos relacionados à avaliação microbiológica e ao processo de higienização dos resfriadores de expansão para leite, sendo a maioria voltada apenas para a avaliação do leite cru.

Considerando que a inativação de microrganismos patogênicos e deteriorantes constituintes de um biofilme é dificultada, renova-se a importância de estudos que busquem elucidar aspectos relacionados ao processo de formação de biofilmes e também ao seu controle. Diversos são os estudos que visam aprimorar o processo de higienização das superfícies que entrarão em contato com os alimentos, muitas vezes, testando diferentes concentrações de sanificantes já utilizados, variando o tempo de contato com a superfície e sua condição de aplicação. Entretanto, a promissora combinação de sanificantes tradicionais com compostos de conhecida atividade antimicrobiana – como os óleos essenciais de plantas – é pouco estudada.

Na área clínica, é significativo o avanço do conhecimento relacionado às interações entre microrganismos e a caracterização de moléculas naturais - como as derivadas de óleos essenciais, animais e organismos marinhos - capazes não apenas de inativar, mas também de prevenir a adesão de microrganismos e/ou de interferir na comunicação microbiana. Nesse sentido, seus promissores resultados justificam pesquisas

visando à aplicação destes conhecimentos também na problemática da indústria de alimentos.

Assim, este estudo propõe-se a isolar e caracterizar microrganismos provenientes de resfriadores de expansão para leite cru em propriedades rurais, estudando também a formação e o controle de biofilmes formados *in vitro*.

Objetivos específicos:

Inferir sobre a presença de biofilme e sobre os procedimentos de higienização dos resfriadores de expansão para leite cru a partir dos resultados de contagem de bactérias psicotróficas e mesófilas;

Isolar dos resfriadores de expansão para leite cru, *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus* e colônias não típicas formadas nos meios de cultura seletivos;

Caracterizar os isolados em relação à produção de lipase, protease e formação de biofilme;

Verificar a atuação de sanificantes (ácido peracético e hipoclorito de sódio), óleos essenciais (alecrim, mandarina verde, mandarina vermelha, laranja, orégano e tangerina) e/ou moléculas envolvidas em *quorum sensing* - 2(5H)-furanona - na formação e na remoção do biofilme formado por um isolado com destacada produção de enzimas/biofilme.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Conceito, formação e tolerância de biofilmes

Biofilmes são o principal padrão de crescimento dos microrganismos na natureza e também na área clínica (SHI & ZHU, 2009; MANN & WOZNIAK, 2012). Podem ser definidos como uma comunidade de células microbianas aderidas a uma superfície e embebidas em matriz polimérica (HALL-STOODLEY et al., 2004; GARRET, 2008). É consenso que todas as espécies bacterianas conhecidas são passíveis de serem isoladas de biofilmes, sendo grande a sua diversidade (HALL-STOODLEY et al., 2004; GARRET, 2008).

A formação de biofilmes é um processo bastante rápido em superfícies ricas em nutrientes, como as da indústria de alimentos (MARCHAND et al., 2012). Inicia-se com a interação das células planctônicas com a superfície, mediadas pela produção de cápsula, fímbrias, flagelos e outras estruturas celulares. Depois de consolidada a adesão, as células multiplicam-se na superfície, formando microcolônias que secretam exopolímeros em grande quantidade, criando um ambiente protegido de adversidades e favorecendo a incorporação de novas células microbianas e também de nutrientes (STOODLEY et al., 2002; GILBERT et al., 2003; HALL-STOODLEY et al., 2004). O processo de formação de biofilmes culmina com

sua eventual dispersão, promovendo a colonização de novas superfícies (HALL-STOODLEY et al., 2004; GARRET, 2008).

A arquitetura de um biofilme é bastante diversa e dependente de diversos fatores, variando da clássica forma tridimensional de cogumelo a biofilmes formados por uma única camada de células (COSTERTON, 1999; MARCHAND et al., 2012). Em biofilmes maduros, a presença de canais de água por entre as microcolônias, permite a difusão de nutrientes, metabólitos e a eliminação de produtos de secreção celular (SAUER et al., 2007).

A formação de biofilmes depende tanto dos microrganismos quanto do material sobre o qual a estrutura é formada. Em relação aos materiais, características como microtopografia, tratamento químico superficial, energia superficial livre e composição química são de grande importância (OH, 2009).

São diversas as vantagens que bactérias crescendo em biofilmes têm em relação à vida planctônica: proteção contra a atuação de antibióticos, desinfetantes e dessecação; sobrevivência à escassez de nutrientes; comunicação intercelular, dentre outras (MEYER, 2003; GARRET, 2008). Recentemente, Dubey & Ben-Yehuda (2011) descreveram a comunicação intercelular mediada por nanotubos, permitindo a troca não apenas de material genético, como também de outros componentes celulares, inclusive entre espécies evolutivamente distantes, como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Dessa forma, o crescimento em biofilmes, pela proximidade entre as células, poderia favorecer também o aparecimento de novos fenótipos.

A tolerância do biofilme aos agentes de controle microbiológico é atribuída a três principais fatores: a proteção conferida pela matriz extracelular;

o estado fisiológico das células, alterado quando crescendo em biofilmes e a possível existência de fenótipos de resistência em sub-populações de células, denominadas *persisters* (HALL-STOODLEY et al., 2004).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que envolve as células microbianas é formada por uma série de componentes, como polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácido teicoico e, inclusive, ácidos nucleicos. Em alguns casos, podem ser encontrados na matriz também cristais minerais, partículas de sílica e componentes sanguíneos (SHI & ZHU, 2009).

A composição química e a estrutura da matriz do biofilme têm fundamental importância para a sobrevivência dos microrganismos ali presentes. Na formação do biofilme de diversas espécies do gênero *Pseudomonas* sp., são encontrados um ou mais dos seguintes polissacarídeos: alginato, levano, Psl, Pel e celulose. Os demais principais componentes da matriz são as proteínas Lap, CdrA, Lec, proteínas associadas a apêndices celulares e ramnolipídios (MANN & WOZNIAK, 2012).

Em biofilmes multi-espécie, comumente encontrados na indústria de alimentos, o compartilhamento de matriz pode favorecer a persistência de patógenos no local. Nesse sentido, tratamentos antimicrobianos aplicados em biofilmes com espécies resistentes, ao invés de selecioná-las, podem proporcionar a sobrevivência de toda uma comunidade (BRIDIER et al., 2015).

2.2. Relevância dos biofilmes para a indústria de alimentos

A formação de biofilmes microbianos nas superfícies de equipamentos da linha de produção de uma indústria de alimentos e até mesmo na superfície dos alimentos é motivo de preocupação. Biofilmes têm se mostrado uma das maiores causas de contaminação cruzada dos produtos alimentícios e de transmissão de doenças (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000; SHI & ZHU, 2009).

Surtos provenientes da transferência de microrganismos de biofilmes foram relatados para patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 (SIMÕES et al., 2010). A importância dos biofilmes das indústrias de alimentos na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos de uso clínico também vem sendo destacada (BRIDIER et al., 2015).

As superfícies de válvulas, esteiras, tubulações, tanques de estocagem e inclusive carros de transporte de mercadorias são frequentemente apontadas como fontes de contaminação devido à formação de biofilmes (SHI & ZHU, 2009). Quando os biofilmes formados em sistemas de tubulação e em trocadores de calor são espessos, podem reduzir a taxa de transferência de calor em processos de controle microbiológico, como a pasteurização, promovendo sua ineficácia (MITTELMAN, 1998). Podem também provocar a corrosão de tanques e tubulações. Biofilmes formados nos pisos, ralos e paredes podem ser fonte de contaminação indireta, na qual os microrganismos

chegam aos alimentos através do ar, manipuladores e também através do próprio procedimento de higienização, via aerossóis ou utensílios de higienização (GIBSON et al., 1999).

2.3. Microrganismos psicrotróficos e a indústria de laticínios

Microrganismos psicrotróficos são os que têm a capacidade de desenvolver-se em 7°C, independentemente de sua temperatura ótima. Neste grupo encontram-se, entre outras, bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. (SORHAUG & STEPANIAK, 1997).

Dentre os microrganismos psicrotróficos, espécies dos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* são frequentemente isoladas de amostras de leite cru refrigerado por estarem disseminadas no ambiente. Estas se destacam pela produção de enzimas extracelulares termoestáveis, principalmente proteases e lipases, as quais contribuem significativamente para a redução da qualidade do leite e de produtos lácteos, mesmo após a aplicação de tratamentos térmicos.

Bacillus cereus destaca-se pela produção de endosporos e por causar intoxicações de origem alimentar (PENG et al., 2001). Em uma planta comercial da indústria de laticínios, essa espécie representou mais do que 12% da microbiota constituinte dos biofilmes (SHARMA & ANAND, 2002). Trata-se de um microrganismo ubíquo produtor de endosporos com superfície hidrofóbica, os quais são capazes de aderir facilmente aos equipamentos da

indústria, sendo também resistentes a diversas condições de stress – incluindo altas temperaturas (PENG et al., 2001).

Pseudomonas sp. é o gênero Gram-negativo mais importante para a redução da vida útil de produtos submetidos ao processo de *Ultra High Temperature* - UHT (MARCHAND et al., 2012). Compõe também a microbiota predominante do leite cru refrigerado, pois além de possuir diversas fontes de contaminação, *Pseudomonas* sp. é favorecido pela baixa temperatura de armazenamento desta matéria-prima, sobrepondo seu crescimento em relação aos demais gêneros de microrganismos (DE JONGHE et al., 2011; RAATS et al., 2011).

Dentre as espécies de *Pseudomonas* sp. mais frequentemente isoladas do leite cru refrigerado estão *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis* e *P. gessardii* (DE JONGHE et al., 2011).

2.4. Quorum sensing em biofilmes

O *quorum sensing* (QS) é um complexo sistema de comunicação intercelular dependente da densidade populacional, sendo frequente em biofilmes devido à proximidade das células. Trata-se de uma comunicação mediada tipicamente por moléculas chamadas de auto-indutores (mas também por outros reguladores globais) que se acumulam no meio e, quando atingem determinadas concentrações, ativam ou reprimem a expressão gênica das células próximas (KELLER & SURETTE, 2006; BEJERANO-SAGIE & XAVIER, 2007).

É através desse sistema que as bactérias conseguem monitorar e responder a suas próprias densidades populacionais, comportando-se como um organismo multicelular (SIMÕES et al., 2010). O *quorum sensing* permite a comunicação, intra-espécie, inter-espécies e até mesmo inter-reinos, entre procariotos e eucariotos, sendo considerado um comportamento social (SCHUSTER et al., 2013).

O QS foi associado a diversos processos celulares, como a expressão de fatores de virulência, quimiotaxia, produção de apêndices celulares, enzimas extracelulares, antibióticos, biosurfactantes, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), resistência a antibióticos, liberação de DNA no meio extracelular, luminescência, dentre outros. Com isso, envolve-se em todas as etapas da formação de biofilmes, atuando no desalojamento de células e, inclusive, na arquitetura do biofilme (DANIELS et al., 2004; SPOERING & GILMORE, 2006; SIMÕES et al., 2010). Estima-se que 10% do genoma de *P. aeruginosa* esteja sujeito à ação de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (WILLIAMS & CÁMARA, 2009).

Dentre as moléculas sinalizadoras envolvidas na comunicação microbiana tem-se como principais, as N-acil-homoserina lactonas (AHLs), em bactérias Gram-negativas, os oligopeptídeos em bactérias Gram-positivas e o sistema auto indutor 2 (AI-2), encontrado em diversas espécies Gram-positivas e Gram-negativas (PARSEK & GREENBERG, 2005; KELLER & SURETTE, 2006). São conhecidas também outras moléculas envolvidas no *quorum sensing*, como o sinal quinolona de *Pseudomonas* (PQS) e a γ -butirolactona, em *Streptomyces* (HOOSHANGI & BENTLEY, 2008). O sistema mediado por

AHL é o melhor caracterizado e, embora não universal, prevalece entre as Proteobactérias, como *Pseudomonas* sp. (RYAN & DOW, 2008; SCHUSTER et al., 2013).

Pseudomonas aeruginosa é uma das espécies que possuem o *quorum sensing* melhor compreendido e, conseqüentemente, serve de modelo para estudo desse processo. Nela, há dois circuitos completos de comunicação através de AHLs, abrangendo a produção (LasI e RhII) de duas diferentes AHLs e de seus respectivos receptores (LasR e RhIR). A ligação das moléculas sinalizadoras (AHLs) com os receptores desses dois circuitos regula a expressão de mais de 300 genes na espécie (SCHUSTER et al., 2013).

Além desses dois circuitos, a *P. aeruginosa* possui também um receptor para a AHL produzida pelo gene LasI, o QscR. Este, além de controlar sua própria gama de genes, reprime genes controlados pelos sistemas LasR e RhIR. Interligando e controlando esses sistemas, inclui-se também a comunicação mediada pelo sinal quinolona de *Pseudomonas* – PQS, dentre outros (BEJERANO-SAGIE & XAVIER, 2007; SCHUSTER et al., 2013). A sobreposição dos diversos circuitos do QS não resulta em falhas na comunicação porque é também regulada por pequenas moléculas de RNA não codificante (sRNA), os quais controlam a expressão gênica em etapas pós-transcricionais (BEJERANO-SAGIE & XAVIER, 2007).

A molécula de sinalização do sistema AI-2 é obtida diretamente a partir do produto do gene *LuxS* e diversas espécies bacterianas possuem homólogos desse gene (SHAUDER et al., 2001; PARSEK & GREENBERG,

2005). Esse sistema de comunicação é o predominante em *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* (HOOSHANGI & BENTLEY, 2008).

2.5. Controle da formação de biofilmes

Segundo Meyer (2003), existem três estratégias básicas na tentativa de resolver o problema dos biofilmes: sanificação antes da formação do biofilme; sanificação após sua formação, utilizando sanificantes potentes; ou utilização de materiais que não favoreçam/impeçam a formação dos biofilmes.

A melhor das estratégias no combate aos biofilmes, ainda segundo Meyer (2003), é prevenir o início de sua formação. Entretanto, a rapidez com que esse processo ocorre na indústria de laticínios (poucas horas) dificulta a adoção dessa estratégia (MARCHAND et al., 2012). Pesquisas que visam à modificação das superfícies inertes tradicionais, visando reduzir a interação com células microbianas nas fases iniciais da adesão têm demonstrado que essa pode ser uma alternativa bastante promissora (BRIDIER et al., 2015).

Sabe-se que quanto menor a carga microbiana da matéria-prima, mais lento será o processo de formação dos biofilmes. Assim, a busca de ferramentas para a remoção de biofilmes dentro do ambiente industrial não pode ser uma prática isolada: é preciso também que se controle a carga microbiana da matéria-prima e a atuação dos manipuladores, ainda em nível de propriedade rural, impedindo ou minimizando o acesso de diversos patógenos e deterioradores à indústria (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000).

Ferramentas como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) têm contribuído

bastante para melhorar o controle microbiológico em nível de indústria de alimentos. Na indústria de laticínios, o método de higienização *clean in place* (CIP), tem se revelado bastante eficaz para a remoção de microrganismos em tubulações e equipamentos de difícil desmontagem. Entretanto, para a obtenção de tal efeito, o método de higienização deve ser aliado à verificação de sua eficiência e à utilização de detergentes adequados (MARCHAND et al., 2012).

É importante destacar que o processo de higienização abrange dois processos principais: a limpeza e a sanificação. A limpeza refere-se à remoção de matéria orgânica e outros resíduos presentes no local a ser higienizado. Para realizá-la, é comum a aplicação de detergentes, cuja formulação é bastante diversa e adaptada às diversas modalidades de indústria de alimentos (ANDRADE, 2008).

A sanificação, por sua vez, tem o objetivo de reduzir as contagens microbianas até níveis seguros de saúde pública. Para realizá-la, podem ser utilizados sanificantes químicos, cujos principais são os à base de hipoclorito de sódio, ácido peracético, amônio quaternário, álcool e clorexidina (ANDRADE, 2008).

Na indústria de laticínios, o hipoclorito de sódio é o sanificante mais utilizado, devido, dentre outros fatores, ao seu baixo custo, eficiência, e ao efeito residual. Entretanto, vem gradualmente sendo preterido pelo ácido peracético, o qual resulta da reação entre ácido acético e peróxido de hidrogênio (ou da oxidação do acetaldeído). O ácido peracético, além de não ser afetado pela presença de matéria orgânica, também é significativamente

menos poluente do que o hipoclorito de sódio (SREY et al., 2013). Ambos são fortes agentes oxidantes e possuem mais de um sítio de atuação na célula, como é característico dos biocidas (MAILLARD, 2002).

Biofilmes formados nos equipamentos e utensílios envolvidos no processamento proporcionam excelentes condições para a tolerância das células aos agentes de higienização, dificultando sua eliminação. A importância de aprimorar os tradicionais métodos de limpeza e sanificação para a eliminação de biofilmes é reforçada também pela detecção de microrganismos resistentes aos sanificantes convencionais, muitas vezes relacionada com a resistência a antimicrobianos de uso clínico (GILBERT & McBAIN, 2003; SIMÕES et al., 2006; SHI & ZHU, 2009).

Paralelamente à questão da resistência microbiana - a qual tende a promover um aumento na concentração de uso dos sanificantes - a necessidade da redução do impacto ambiental no ciclo de vida de produtos alimentícios reflete-se diretamente nas classes de produtos químicos utilizados na higienização de equipamentos e utensílios. É crescente o interesse por alternativas que, além de eficazes no controle microbiológico, produzam resíduos com menor potencial poluidor, as chamadas “eco amigáveis” ou “verdes” (SIMÕES et al., 2010).

Nesse contexto, estão disponíveis para o controle de biofilmes, ferramentas como o uso de complexos enzimáticos que rompem sua matriz polimérica e facilitem o contato do sanificante com as células microbianas, podendo reduzir sua concentração de uso (JOHANSEN et al., 1997). Houry et al. (2012) verificaram que a motilidade pronunciada de alguns microrganismos

na superfície do biofilme forma poros transitórios na matriz, capazes de facilitar a penetração de moléculas. Assim, a adição desses microrganismos como uma etapa do processo de higienização, poderia contribuir para a remoção do biofilme.

De forma bastante promissora, vislumbra-se também para o controle de biofilmes, o uso de compostos naturais extraídos de culturas microbianas, animais ou plantas, enzimas, moléculas antagonistas ao *quorum sensing*, ozônio, água ácida eletrolisada e até mesmo bacteriófagos, naturais ou geneticamente modificados (MARTINELLI, 2004; BROOKS & FLINT, 2008; DAVIDSON et al., 2013; ENDERSEN et al., 2014; BRIDIER et al., 2015).

2.5.1. Óleos essenciais

Óleos essenciais são complexas misturas de líquidos aromáticos e voláteis produzidos no metabolismo secundário das plantas em resposta a fitopatógenos e insetos. Podem ser extraídos de diferentes partes dos vegetais, como folhas, flores, frutos, sementes. Diversos apresentam propriedades antimicrobianas, incluindo ação sobre biofilmes (SZCZEPANSKI & LIPSKI, 2014; HYLDGAARD et al., 2012). Podem também apresentar propriedades antioxidantes, antimutagênicas, anti-inflamatórias, anti-diabéticas, e inclusive, ser utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer (RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

São conhecidos em torno de 3000 tipos de óleos essenciais, sendo aproximadamente 300 comercialmente utilizados como aromatizantes ou fragrâncias (HYLDGAARD et al., 2012; RAUT & KARUPPAYIL, 2014). O Brasil

é um dos principais produtores de óleos essenciais, assim como os Estados Unidos, Índia e China. Estima-se que sejam comercializadas aproximadamente 70.000 toneladas/ano desse produto no mundo (RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

Dentre os óleos comerciais mais produzidos mundialmente e com maior valor comercial estão os de laranja (*Citrus sinensis*), *Mentha* spp., eucalipto (*Eucalyptus globulus*), citronela (*Cymbopogon* sp.), limão (*Citrus limon*), cravo (*Syzygium aromaticum*), e cânfora (*Cinnamomum camphora*) (RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

Alguns óleos essenciais e diversas moléculas deles extraídas têm sido reconhecidos como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela *Food and Drug Administration* (FDA) americana, sendo utilizados com maior aceitação nas indústrias de alimentos e também na medicina. Dentre os óleos essenciais brutos considerados GRAS estão o de cravo, orégano, tomilho, noz-moscada, manjerição, mostarda e canela (HYLDGAARD et al., 2012). Na indústria de alimentos, sua principal aplicação é como aromatizantes, mas é promissor seu uso também no controle microbiológico de produtos alimentícios (DAVIDSON et al., 2013).

Devido a sua característica hidrofóbica, os óleos essenciais são incorporados às membranas celulares, alterando sua permeabilidade, provocando o mau funcionamento e, inclusive, o vazamento de componentes celulares, culminando com a morte celular (BURT, 2004). Dentre os óleos com melhor atividade antimicrobiana comprovada, estão os de cravo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), cujos principais componentes são compostos

fenólicos como o eugenol, o cinamaldeído, o carvacrol e o timol, respectivamente (DAVIDSON et al., 2013).

Os principais entraves para a aplicação de óleos essenciais como conservantes ou na higienização da indústria de alimentos são: (i) a dificuldade na padronização da composição química dos óleos essenciais, a qual é afetada pelas condições de cultivo da planta, colheita, armazenamento, método de extração do óleo; (ii) a provável diferença entre a concentração de uso estabelecida *in vitro* e a concentração de uso no alimento, em uma situação real; (iii) a alteração das propriedades sensoriais tradicionais do alimento provocada pelo óleo essencial (BURT, 2004).

A utilização de componentes isolados dos óleos essenciais é bastante investigada e poderia, dependendo do caso, reduzir o efeito sensorial indesejável nos alimentos. Entretanto, apesar da comprovada ação antimicrobiana de alguns componentes isolados, a eventual ação sinérgica dos diferentes compostos no óleo integral não deve ser desconsiderada. Como efeitos positivos desse sinergismo estão a atuação sobre diversos alvos celulares e a redução da aquisição de resistência microbiana (BAKKALI et al., 2008).

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Neste estudo, serão apresentados três artigos científicos, nas seções 3.1 a 3.3. Além disso, será apresentado o resumo de um quarto artigo, elaborado em colaboração com colegas (APÊNDICE 7.1).

3.1. Artigo 1: Adhesion and Production of Degrading Enzymes by Bacteria Isolated from Biofilms in Raw Milk Cooling Tanks.

Artigo publicado no Periódico Ciência e Tecnologia de Alimentos: v. 34, n. 3: 571-576, 2014.

Relevância do trabalho:

O controle da formação de biofilmes é um entrave para a indústria de laticínios, que se acentua em nível de propriedade rural. Entretanto, há relativamente poucos trabalhos relacionados às condições higiênico-sanitárias dos tanques para resfriamento do leite: a maioria concentra-se apenas no leite cru.

A exigência legal da refrigeração do leite na propriedade rural confere importância aos microrganismos psicrotóxicos. Este trabalho visa caracterizar microrganismos psicrotóxicos e sua capacidade de formar biofilmes, destacando seu potencial para a contaminação do leite não apenas com células, mas também com enzimas de degradação, as quais inviabilizam a elaboração de alguns produtos lácteos.

Adhesion and Production of Degrading Enzymes by Bacteria Isolated from Biofilms in Raw Milk Cooling Tanks

Juliana Flach¹, Valeska Grzybowski², Geciane Toniazzo³, Gertrudes Corção^{4*}

1 – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA-UFRGS). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS - Campus Erechim. Av. Domingos Zanella, 104 - CEP: 99700-000 - Erechim - RS - Brazil. <juli_flach@yahoo.com.br>.

2 - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Campus Erechim. Av. Sete de Setembro, 1621 - CEP: 99700-000 - Erechim - RS - Brazil. <valeska_grzy@hotmail.com>.

3 - Departamento de Ciências Agrárias – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - URI – Campus Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 - CEP: 99700-000 - Erechim - RS - Brazil. <gtoniazzo@uri.com.br>.

4 - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Sarmiento Leite, 500 - CEP: 90050-170 - Porto Alegre - RS - Brazil. Telefone/Fax: (xx 51) 3308- 4111. <corcao@ufrgs.br>. * Corresponding author.

ABSTRACT

Biofilms in milk cooling tanks compromises the product quality even on the farm. Due to the lack of studies of this nature, this study aimed to evaluate the microbiological conditions of raw milk cooling tanks on farms and to characterize the microorganisms isolated from these devices. Swab samples from seven milk cooling tanks were collected, at three different points in each tank. Mesophiles and psychrotrophic counts were performed in all samples. The isolation of *Pseudomonas* spp., *Bacillus cereus* and not typical colonies formed on selective media were also done, totalizing 297 isolates. All these isolates were tested for protease and lipase production and biofilm formation. From the total isolates, 62.9% produced protease, 55.9% produced lipase and 50.2% produced biofilm. *Pseudomonas* was the widespread genus inside the milk cooling tank, since it was not possible to associate this contamination to a single sampling point in the equipment. High counts of microorganisms were found in some cooling tanks indicating deficiencies in the equipment cleaning process and providing strong evidence of microbial biofilm presence. Also, it is worth to notice the milk potential contamination with both, microbial cells and their degrading enzymes, which compromises the quality of the milk.

Keywords: psychrotrophic, cleaning process, lipase, protease.

1. INTRODUCTION

Biofilms are a major form of microbial growth and its occurrence is ubiquitous (COSTERTON, 1987; COSTERTON et al., 1995). In food industry, they are considered one of the major sources of cross contamination (SHI, ZHU, 2009). Mainly because the extracellular matrix of biofilms might be responsible for the high resistance of microorganisms to sanitizers, allowing pathogenic and spoilage bacteria to survive the sanitization process (MEYER, 2003).

The actual Brazilian legal recommendation of milk cooling on the dairy farm (BRASIL, 2011) brought many benefits for the maintenance of its microbiological quality. However, inadequate cleaning of the milk cooling tanks favors biofilm formation on its inner surface (SIMÕES, SIMÕES, VIEIRA, 2010). Therefore, controlling biofilm formation on the farm is a challenge and there are relatively few

published results about microbiological contamination and cleaning of milk cooling tanks. The research focus mainly on the microorganisms isolated from raw milk.

Biofilms in cooling tanks can compromise the milk quality and also prevent their use by the food industry. This occurs mainly by the action of psychrotrophic species like *Bacillus cereus* (also an enterotoxin producer) and *Pseudomonas*, which reproduce at refrigeration temperatures and produce thermostable enzymes that can alter the food even after microbial inactivation (PINTO, MARTINS, VANETTI, 2006).

This work aimed to evaluate the microbiological conditions of raw milk cooling tanks on farms and to characterize the remaining bacteria after the cleaning procedure.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental design

The study was conducted in seven dairy farms from Erechim (RS, Brazil). The main criteria used to select the farms was the near distance to Erechim town center, the interest of the farmers in participating, and the existence of an empty (and clean) milk cooling tank in the farm at the day and time established for the sample collection.

2.2 Sample collection

Three samples were collected from each milk cooling tank: on the side, on the homogenizer and on the milk drain valve. Areas of 10cm x 10cm from the side and homogenizer were sampled with sterile swabs moistened in phosphate buffer (pH 7.2). Total inner extension of milk drain valve was sampled with swab. The drain valve was measured and its area was calculated in order to express the counts in CFU/cm².

Samples were transported to the laboratory in a cool box with ice and analyzed immediately after. The time elapsed between cleaning the tank and sample collection (when the equipment remained off at room temperature) was about six hours.

2.3 Count and microorganism isolation

Swabs containing microbial cells were resuspended in phosphate buffer solution for 1 minute. The suspension was serially diluted in peptone water (0.1%) and inoculated into *Pseudomonas* Agar Base and Cetrimide Agar plates (Himedia) for isolation of *Pseudomonas* spp. with incubation at 30°C for 48h. The suspension was also inoculated into Cereus Agar (MERCK) for isolation of *Bacillus cereus* (30°C for 48h) and Plate Count Agar (PCA - Acumedia) for heterotrophic mesophiles (35°C for 48h) and psychrotrophic (6.5°C for 240h) total counts.

Plates of PCA agar with 25 to 250 colonies and also their consecutive dilution were selected for counting (BRASIL, 2003). In plates of selective media for *Pseudomonas* and *B. cereus*, typical and also non typical colonies were isolated, in order to obtain isolates with different colonial morphologies which were representative of the diversity of morphologies observed. At least 21 colonies of each milk cooling tank were isolated. All isolates obtained were maintained frozen (-20°C) in Tryptone Soy Broth (TSB - Himedia) with glycerol (25%).

2.4 Pseudomonas spp. and Bacillus cereus identification

Typical colonies of *B. cereus* in selective medium were tested for confirmation of species (BRASIL, 2003). Isolates that showed typical colonies of the genus *Pseudomonas* in selective media were grouped according to colonial and Gram stain

morphology and were subjected to biochemical tests (Oxidation / Fermentation of glucose, nitrate reduction, oxidase and catalase production) to confirm genus (MACFADDIN, 2000; BRENER, 2005). One or two isolates representing each of the typical colony morphology groups were confirmed as *Pseudomonas* by amplification and sequencing of a fragment from the 16S rRNA gene.

The DNA was extracted according to Misbah et al. (2005), with modifications. After growth in Tryptone Soy Agar (TSA – Himedia), two or three colonies were taken in a microtube with 100 µL of TE buffer (Tris-HCl / EDTA; pH 8,0) and boiled for 10 min. Then, 100 µL of chloroform- isoamyl alcohol (24:1) were added. The microtube was centrifuged at 12.000 x g (10 min) and the supernatant transferred for another microtube. 1 µL of this supernatant was used in the PCR reaction (Mastercycler Personal termocicler (Eppendorf AG 22331 – Hamburg). The primers used and the amplification conditions were according to Spilker et al. (2004). Aliquots of 30–60 ng of a 618 bp PCR product and 4.5 pmol of primers were subjected to automated sequencing (ABI-PRISM 3500 Genetic Analyser) by the ACTgene Molecular Analysis Laboratory (Porto Alegre, RS). Both strands were sequenced with the same primers used for amplification.

The sequences were identified using Standard Nucleotide BLAST (available on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), using 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) database, optimized for highly similar sequences (megablast). Isolates were considered *Pseudomonas* spp. if their sequences showed the highest degree of similarity (99%) to sequences of *Pseudomonas* spp.

2.5 Enzymes production

All isolates obtained from selective media were tested for production of protease and lipase. To verify the production of protease, they were inoculated into milk agar (skimmed milk 100g/L; yeast extract 1.5g/L; agar 15g/L) and incubated for 48 hours at 30°C. The presence of degradation halos around the colonies indicated positive result (BUDI et al., 2000). As a positive control for the test, *B. cereus* ATCC 11778 strain was used.

For lipase production, the isolates were inoculated into culture medium containing olive oil and rhodamine B and incubated 72 hours at 30°C. The emission of orange fluorescence under U.V. light represented a positive result (KOUKER, JAEGER, 1987, with modifications). As positive and negative controls for the test, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 23229 strains were used, respectively.

2.6 Quantification of biofilm production

All isolates with typical and non typical colonies obtained from selective media had their biofilm formation capacity quantified, as Stepanovic et al. (2000; 2007), with modifications. The isolates were subcultured on Tryptone Soy Agar (TSA - Himedia) for two consecutive days for cells activation. Thereafter, a cell suspension was performed in Tryptone Soy Broth (TSB- Himedia) with turbidity adjusted according to McFarland standard 0.5 (equivalent to 1.5×10^8 CFU/mL). Then, 200 μ L of the cell suspension was aliquoted in triplicate on polystyrene microplates with 96 wells and incubated at 30°C/24h. As negative control, 200 μ L sterile TSB was used in each microplate. Each well was washed three times with sterile saline solution (NaCl 0.9%)

to remove loosely adhered cells. The adhered cells were fixed with 200 μL of 99% methanol (15 min) and the microplate air dried. The cells were stained with 200 μL of Hucker crystal violet solution (2%, 5 min). The dye was drained and rinsed with tap water, with subsequent drying of the microplate. Finally, the dye remaining in the wells was resolubilised in 160 μL of glacial acetic acid (33%).

The reading of the optical density (OD) was performed in a microplate reader (EL800 Biotek Instruments, INC.) at λ of 490 nm. The mean and standard deviation of the negative control were also calculated, and the cutoff (OD_c) established as three standard deviations above the mean of negative control. The isolates with $\text{OD} \leq \text{OD}_c$ were considered not biofilms forming; weak formers with $\text{OD}_c < \text{OD} \leq (\text{OD}_c \times 2)$; moderate formers with the $(\text{OD}_c \times 2) < \text{OD} \leq (\text{OD}_c \times 4)$ and strong formers with $(\text{OD}_c \times 4) < \text{OD}$.

2.7 Statistical Analysis

The results of mesophiles and psychrotrophic counts were statistically analyzed using ANOVA (Analysis of Variance) with multiple comparisons of means by Bonferroni. The different sample points were compared considering for mean the sample point values obtained from the seven farms evaluated. Mesophiles and psychrotrophic counts for each sample point were summed. The different farms were compared using the mean of the total counts of the three sample points obtained of for each farm. All of the count results were transformed to an \ln value for the statistical analysis procedure.

To analyze the results of biofilm formation, the Kruskal Wallis test was used. The results of lipase and protease production were analyzed using the X^2 test for

association (SPSS software version 18.0 - Nucleus for Statistical Analysis – NAE/UFRGS).

3. RESULTS

In three dairy farms it was observed the predominance of mesophiles in all sampling points. The dairy farm six was the only with psychrotrophic predominance in all sampling points (Table 1). The contamination observed on the milk drain valve differed statistically from the other points ($p < 0.05$). However, it was not possible to associate mesophiles or psychrotrophic counts with a particular sampling point, showing its homogeneous distribution inside the tank. There was also no significant difference in the contamination among the different farms, possibly due to the large variability found in the scores.

From the typical and non typical colonies on selective medium, 297 isolates were obtained. Isolates from non typical colonies were not identified and 66 of the typical colonies were identified as *Pseudomonas* and five as *Bacillus cereus*. *Pseudomonas* was a widespread genus inside the milk cooling tank, since it was not possible associate its contamination to a single collection point in the equipment ($p < 0.05$).

All 297 isolates were tested for lipases and proteases production and biofilm formation (Tables 2 and 3). 62.9% were able to produce protease and 55.9% produced lipase. All isolates of *B. cereus* produced protease, but none was lipase producer. One isolate from *B. cereus* was considered weak biofilm former and the others were unable to produce biofilm.

There was a positive association between lipase production and the milk homogenizer sampling point of the isolates ($p < 0.05$), whereas no production of this enzyme was associated with isolates of the side sampling point. There was no association between the sampling points in the cooling tank and protease production.

Table 1: Mesophiles and psychrotrophic counts inside the milk cooling tanks (CFU/cm²) in the seven farms analyzed. The collections were made after farmers routine cleaning of the equipments.

<i>Farm</i>	<i>Collection point</i>	<i>Mesophiles Count (CFU/cm²)</i>	<i>Psychrotrophic Count (CFU/cm²)</i>
1	Side	5.9x10 ¹	1.3x10 ²
	Homogenizer	4.3x10 ²	1.9x10 ²
	Drain Valve*	1.0x10 ⁵	4.0x10 ⁴
2	Side	2.4x10 ⁴	2.3x10 ⁴
	Homogenizer	2.2x10 ³	2.1x10 ³
	Drain Valve*	3.2x10 ⁷	1.8x10 ⁷
3	Side	5.6x10 ²	1.1x10 ²
	Homogenizer	1.5x10 ³	1.1x10 ³
	Drain Valve*	1.6x10 ⁵	4.2x10 ⁴
4	Side	4.0x10 ³	2.2x10 ³
	Homogenizer	6.4x10 ³	5.7x10 ³
	Drain Valve*	3.3x10 ⁵	2.0x10 ⁵
5	Side	4.1x10 ²	4.9x10 ²
	Homogenizer	2.6x10 ⁴	4.0x10 ³
	Drain Valve*	1.6x10 ⁵	1.1x10 ⁵
6	Side	9.2x10 ⁴	1.4x10 ⁵
	Homogenizer	1.7x10 ⁵	8.4x10 ⁵
	Drain Valve*	9.3x10 ⁶	1.3x10 ⁷
7	Side	3.0x10 ⁴	1.8x10 ⁴
	Homogenizer	2.7x10 ³	3.4x10 ³
	Drain Valve*	2.8x10 ⁷	5.7x10 ⁷

* Significant difference ($p < 0.05$)

Half of isolates (50.2%) showed some ability to form biofilms (Tables 2 and 3). The homogenizer sampling point was statistically different of the milk drain valve ($p < 0.05$) when analyzing biofilm formation. In addition, isolates from milk drain valve had a tendency to be classified as non-biofilm formers. Oppositely, isolates from the homogenizer tended to be classified as weak or moderate formers.

Table 2: Source of non-typical colonies and *Bacillus cereus* isolates, their enzyme production and biofilm formation.

Collection point	Isolates of non-typical colonies	B. cereus isolates	Extracellular enzyme		Quantification of biofilm formation*			
			Protease	Lipase	NOT ⁱ	WEA ⁱⁱ	MOD ⁱⁱⁱ	STR ^{iv}
Homogenizer ^{*,#}	67	0	36	40 [#]	26	28	11	2
Side	51	5	33	24	27	20	7	2
Drain Valve [*]	108	0	58	52	59	36	10	3
Total	231		127	116	112	84	28	07
(Percentage)			54.9%	50.2%	48.5%	36.4%	12.1%	3.0%

ⁱ not former; ⁱⁱ weak former; ⁱⁱⁱ moderate former; ^{iv} strong former. ^{*,#} Significant ($p < 0.05$)

Table 3: Source of *Pseudomonas* spp. isolates, their enzyme production and biofilm formation.

Collection point	Pseudomonas isolates	Extracellular enzyme		Quantification of biofilm formation*			
		Protease	Lipase	NOT ⁱ	WEA ⁱⁱ	MOD ⁱⁱⁱ	STR ^{iv}
Homogenizer ^{*,#}	17	16	15 [#]	5	8	4	0
Side	12	10	7	7	4	1	0
Drain Valve [*]	37	34	28	24	9	4	0
Total	66	60	50	36	21	9	0
(Percentage)		90.9%	75.6%	54.5%	31.9%	13.6%	

ⁱ not former; ⁱⁱ weak former; ⁱⁱⁱ moderate former; ^{iv} strong former. ^{*,#} significant ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

The high counts of microorganisms (up to 10^6 CFU/cm²) found in some cooling tanks indicate deficiencies in the equipment cleaning process and provide strong evidence about the presence of microbial biofilms. Hood and Zottola (1995) reported that bacterial counts of 10^3 CFU/cm² not characterize a microbial biofilm, but even the relatively low contamination levels found in some farms must be considered, since the biotransfer potential of microbial cells and the possible sanitizing resistance increase (PENG, TSAI, CHOU, 2001).

The predominance and/or high counts of mesophiles found in the equipment were not expected, since the low temperature disfavors their growth. Thus, we can draw two main hypotheses to explain this result: contamination of the equipment with mesophiles had occurred during the cleaning procedure (from water, cleaning helpers or environment); another hypothesis is that the cooling process of the cooling tank had failure, allowing this group stays and establish in the equipment.

The pertinent legislation about raw milk production in Brazil (BRASIL, 2011) requires its refrigeration on the dairy farm, as well as the cooling tank cleaning performed according to the manufacturer's recommendation. However, even with a superficial evaluation (visual observation or informal talk with the farmers), it was noticed that the cleaning of the cooling equipment was performed by workers often not adequately trained to do so. As many factors might result in process failure - like choice of sanitizers, inadequate cleaning method and/or tools, lack of financial resources - the conditions for microbial biofilms formation can be established (SIMÕES, SIMÕES, VIEIRA, 2010).

Therefore, it is recommended the development of training programs for farmers in order to raise the quality of the cleaning performed on dairy farms. They should focus on aspects such as: the importance of acquiring chemicals for cleaning, as recommended by the manufacturer and/or technical assistance; the importance of mechanical action in the cleaning method; water quality; the need to thoroughly rinse the drain valve of the milk and to keep the equipment closed after cleaning and during milking intervals.

The predominance of biofilm formers in the homogenizer was not observed for the cooling tank drain valve. One possible reason could be the difference in selective pressure for colonization in these sampling points: the homogenizer, in constant motion during the use of the equipment, might have disfavored the colonization of non-adherent microorganisms. Figueiredo et al. (2009) showed an inversely proportional relationship between *Pseudomonas* remained attached number and the flow speed of milk over a surface, reaching stability at speeds from 1.0 m/s.

The contamination level of the milk drain valve can also be related to the fact that this is a difficult site to clean (or neglected hygiene): in various cooling tanks, milk residues remaining after cleaning were visible in the swab used for sampling. The homogenizer, moreover, is an easy to access site and besides the selective pressure associated with movement, it would select microorganisms capable of withstanding the mechanical action exerted by the handler at the time of cleaning.

Although the entire milk drain valve is not in contact with the milk constantly, it represents an important source of contamination of the raw material at the time of their transfer to the isothermal transport vehicle. In addition, the remaining milk waste not

only favors the microorganisms permanence, as well as support microbial growth during the interval of milk sampling.

In general, biofilms which occur in cooling tanks and in the food industry are multi-species. In the biofilm formation process and in the metabolic activity of a mature biofilm, each microbial species has a quite peculiar role and *Pseudomonas*, besides being important in contamination of refrigerated raw milk (ERCOLINI et al., 2007), is one of the active genera in the initial rapid colonization of surfaces. After consolidation of adhesion, it causes significant changes in the physicochemical properties of the surface and probably favors the incorporation of several other species with reduced adhesion capacity (ZOTTOLA, SASAHARA, 1994; IBUSQUIZA et al., 2012).

Due to its ubiquitous distribution, water, air, food handlers, skin/fur, dairy cattle feed and many others may be considered sources of milk contamination by *Pseudomonas* (DOGAN, BOOR, 2003). Thus, its presence in cooling tanks might be associated with small failures in their sanitization and even in dairy cattle management. Fagundes et al. (2006) encountered significant differences in *Pseudomonas* counts in freshly and refrigerated raw milk, when comparing farms with adequate and inadequate management. The origin of water (surface or underground) also played a significant role in the microbial search of this bacterium. Identifying the origin of *Pseudomonas* isolates was not the objective of the present study, but it is possible that many of them have just been deposited on the surface of the equipment during or after the cleaning process. This may have contributed to the increase in the number of isolates classified as non-biofilm formers. In addition, most *Pseudomonas* isolates were obtained from the drain valve sampling point, which is associated with less selective colonization pressure.

Although sufficient to confirm genus, the sequencing result of the amplified 16S rRNA gene fragment was not conclusive for *Pseudomonas* species determination. Though almost the entire 16S rRNA gene had been sequenced, intraspecific differentiation was difficult because *Pseudomonas* genus have very conserved sequences in this region (ANZAI et al., 2000). The species with the highest similarity with the tested isolates were *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. poae*, *P. tolaasii*, *P. gessardii*, *P. mucidolens* and *P. koreensis*. Considering that many of them have environmental origin and act in milk and dairy products spoilage (ENEROTH, AHRNÉ, MOLIN, 2000), this result was expected.

The biofilm formation by the isolates corroborated with the counts results and its relationship to the presence of biofilms on the equipment: more than half were considered capable of forming biofilms. It is worth mentioning that the presence of biofilms in cooling tanks is not only a perennial source of milk contamination by microorganisms. In this work, the milk contamination with degrading enzymes (lipase and protease) bacteria has also proved a point to be highlighted, given the significative milk spoilage potential presented by the isolated microorganisms.

Enzyme production by spoilage microorganisms has been extensively studied. However, only recently the biofilms were seen as potential reservoirs not only of undesirable microorganisms but also of enzymes that might compromise the product quality (TEH et al., 2014). The biofilm structure protects the enzyme, creates microenvironments favorable to the production and changes the cellular physiology of the microorganisms (WANG, CHEN, 2009). Teh et al. (2012; 2013), found that proteolytic and lipolytic activities were higher in cells growing in biofilms than in planktonic form. *P. fluorescens*, for example, retained proteolytic activity in 37°C only

when in biofilms. In the present study, among the 297 isolates, 62.9% were able to produce protease and 55.9% produced lipase, so more than half of them showed potential for milk spoilage. Approximately 90% and 75% of the *Pseudomonas* strains were, respectively, protease and lipase producers, and most of them came from the drain valve. Then, this place is a potential source of milk spoilage bacteria, which enzymes can act on the milk during all the manufacturing steps, promoting shelf life reduction and economical lost for the industry.

The microbial diversity found in biofilms may also contribute to the increased potential for food alterations. Teh et al. (2013) found that the lipolytic activity of *Streptococcus uberis* and *P. fluorescens* only occurred in the biofilm formed by strains in co-culture. Moreover, the importance of biofilms in view of enzyme production is such that the concepts of cell-associated enzyme and enzyme-free cells were adapted to this form of cell growth: enzymes linked to the biofilm matrix are still considered as cell-associated; the enzymes released into the environment that surrounds the biofilm are considered as cell-free enzymes (WANG, CHEN, 2009).

The proteolytic enzymes are associated with the bitter flavour of milk and its gelatinization after prolonged storage due to the hydrolysis of peptide bonds. The lipolytic are associated with rancidity and instability of beverages based on milk foam. Due to its heat resistance, both categories of enzymes are associated with, among others, reduced shelf life of UHT milk (SØRHAUG, STEPANIAK, 1997; TEH et al., 2012). Of the 66 isolates of *Pseudomonas*, 47 (71.2 %) were able to produce protease and lipase as well, corroborating the prominent of the genus, considered the main deteriorating agent of dairy products (ERCOLINI et al., 2007; MARCHAND et al., 2009).

5. CONCLUSION

The results indicate that the cleaning procedure of milk cooling tanks are not being effective in the analyzed dairy farms and they should be reviewed since they are contributing to the establishment of biofilms on equipments. Most microorganisms isolated following the cleaning procedure were able to produce degrading enzymes and to form biofilms, highlighting the raw milk contamination potential not only by microorganisms, but also by their enzymes.

6. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1563-1589, 2000.

BRASIL. Instrução Normativa nº. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, n. 181, p. 14- 51.

BRASIL. Instrução Normativa nº. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru

Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1, n. 251, p. 6- 11.

BRENER, J. D. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two - The Proteobacteria**. 2. ed. Boston: Springer, 2005. 1136p.

BUDI, S. W.; TUINEN, D. V.; ARNOULD, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANIAZZI-PEARSON, V.; GIANIAZZI, S. Activity of *Paenibacillus* sp. Strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 191- 199, 2000.

COSTERTON, J. W. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435– 464, 1987.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711- 745, 1995.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 130- 138, 2003.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5-6, p. 325- 331, 2000.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis* and *P. putida* from meat by a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2354- 2359, 2007.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 568- 572, 2006.

FIGUEIREDO, H. M.; ANDRADE, N. J.; OZELA, E. F.; MORALES, G. P. Influência da velocidade de circulação do leite na adesão de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 469- 473, 2009.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n. 1, p. 9- 18, 1995.

IBUSQUIZA, P. S.; HERRERA, J. J. R.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L. Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. **Food Control**, v. 25, p. 202- 210, 2012.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211- 213, 1987.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria**. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MARCHAND, S.; HEYLEN, K.; MESSENS, W.; COUDIJZER, K.; DE VOS, P.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L.; DE BLOCK, J.; HEYNDRIKX, M. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *P. lundensis* and *P. fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 467- 482, 2009.

- MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 249- 253, 2003.
- MISBAH, S.; HASSAN, H.; YUSOF, M. Y.; HANIFAH, Y. A.; ABUBAKAR, S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Medical Journal**, v. 46, n. 9, p. 461-464, 2005.
- PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 105- 111, 2001.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicotróficas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645- 651, 2006.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407- 413, 2009.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science Technology**, v. 43, p. 573- 583, 2010.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35- 41, 1997.
- SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 42, p. 2074- 2079, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175- 179, 2000.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica –APMIS**, v. 115, p. 891- 899, 2007.

TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; ANDREWES, P.; BREMER, P.; LINDSAY, D. Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 28- 34, 2012.

TEH, K. H.; LINDSAY, D.; PALMER, J.; ANDREWES, P.; BREMER, P.; FLINT, S. Lipolysis within single culture and co-culture biofilms of dairy origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 129- 135, 2013.

TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; ANDREWES, P.; BREMER, P.; LINDSAY, D. Biofilm - An unrecognized source of spoilage enzymes in dairy products?. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 32- 40, 2014.

WANG, Z. W.; CHEN, S. L. Potential of biofilm-based biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 1- 18, 2009.

3.2. Artigo 2: Ação individual e combinada de sanificantes e óleos essenciais sobre células planctônicas e biofilmes de *Pseudomonas* sp. isolada de tanque para resfriamento de leite

Artigo a ser submetido para o Periódico *Brazilian Archives of Biology and Technology* – BAPT.

Ação individual e combinada de sanificantes e óleos essenciais sobre células planctônicas e biofilmes de *Pseudomonas* sp. isolada de tanque para resfriamento de leite

Atividade antimicrobiana de sanificantes e óleos essenciais

Juliana Flach¹, Raíza de Almeida Mesquita², Felipe Vedovatto², Mariane Lobo Ugalde^{3,5}, Rogério Luis Cansian³, Geciane Toniazco³, Gertrudes Corção^{4,*}

1 – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA-UFRGS). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS - Campus Erechim. Av. Domingos Zanella, 104 - CEP: 99700-000 - Erechim - RS - Brasil.

2 - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Campus Erechim. Av. Sete de Setembro, 1621 - CEP: 99700-000 - Erechim - RS - Brasil.

3 - Departamento de Ciências Agrárias – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - URI – Campus Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 - CEP: 99700-000 - Erechim - RS - Brasil.

4 - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Sarmento Leite, 500 - CEP: 90050-170 - Porto Alegre - RS - Brasil. Telefone/Fax: (xx 51) 3308- 4111. <corcao@ufrgs.br>. * Autora para correspondência.

5 - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha - Campus Júlio de Castilhos –Júlio de Castilhos – RS, Brasil.

Resumo

*Biofilmes permitem a sobrevivência microbiana à sanificação e são uma das principais causas de contaminação cruzada na indústria de alimentos. Este trabalho visa, de forma inovadora, avaliar a ação de sanificantes e óleos essenciais, isolados ou em combinação, frente a células planctônicas e biofilmes já estabelecidos por *Pseudomonas* sp., simulando uma condição de higienização repetitiva. Foram determinadas a CIM, MBC_p , MBC_b e a MBEC para os óleos essenciais de orégano e alecrim, bem como para ácido peracético e hipoclorito de sódio. A MBC_b e a MBEC foram também determinadas após tratamentos com ácido peracético combinado com os óleos essenciais, durante três dias consecutivos sobre o mesmo biofilme. A avaliação da remoção/desalojamento das células foi efetuada com cristal violeta e microscopia confocal a laser. Verificou-se que o crescimento em biofilmes elevou consideravelmente a tolerância da cepa aos sanificantes, comparada ao crescimento planctônico. A combinação de ácido peracético com os óleos não alterou a MBEC/ MBC_b em nenhum dos dias de tratamento. Hipoclorito de sódio e ácido peracético foram capazes de inativar as células do biofilme, mas somente o primeiro foi capaz de também desalojá-lo. Destaca-se a importância da limpeza nos programas de higienização, bem como a necessidade de padronização da formulação dos sanificantes e do uso de terminologia adequada para favorecer a comparação de trabalhos relacionados. Este trabalho oferece também uma promissora alternativa para pesquisas futuras.*

Palavras-chave: ácido peracético, hipoclorito de sódio, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*.

INTRODUÇÃO

Biofilmes microbianos são agregados de células aderidas a uma superfície e envoltas em matriz. Na indústria de alimentos, representam uma das principais causas de contaminação cruzada e um entrave a ser enfrentado. Além do aumento substancial da resistência aos sanificantes promovida pela matriz e pela fisiologia celular alterada, o crescimento em biofilmes confere uma série de vantagens aos microrganismos (Meyer 2003; Shi e Zhu 2009).

Ácido peracético e hipoclorito de sódio são dois dos sanificantes mais utilizados na indústria de alimentos. O ácido peracético, além de ser eficaz contra todos os grupos microbianos, é também uma alternativa menos poluente quando comparado ao hipoclorito de sódio, razão pela qual seu uso vem aumentando consideravelmente em detrimento deste, tanto na área da produção de alimentos, quanto na da saúde (Srey et al. 2013).

Dentre as alternativas com menor potencial poluidor para inativação de microrganismos, inclui-se também o uso de óleos essenciais extraídos de plantas: além de serem compostos naturais, alguns óleos como o de orégano possuem excelente atividade antimicrobiana, inclusive contra cepas multirresistentes (Bozin et al. 2006). Além disso, resultados bastante promissores foram encontrados, mais frequentemente, na prevenção da adesão e formação dos biofilmes (Szczepanski e Lipski 2014), embora também haja trabalhos que visem à erradicação de biofilmes já formados (Jadhav et al. 2013), ou à substituição dos sanificantes pelos óleos (Azeredo et al. 2011).

A aplicação de óleos essenciais na indústria de alimentos, além de onerosa, não deve afetar as propriedades sensoriais dos produtos (Raut e Karuppayil 2014). Assim, testes *in vitro* com óleos essenciais visando à aplicação comercial futura são direcionados para concentrações reduzidas (e, muitas vezes, sub-inibitórias) dos mesmos. Sabe-se que os óleos essenciais de diversas plantas afetam certas atividades microbianas como a formação de biofilmes, mesmo em concentrações sub-inibitórias (Szczepanski e Lipski 2014).

Paralelamente à preocupação ambiental relacionada ao uso de agentes químicos, a constatação de que os biofilmes são a principal forma de crescimento microbiano fez com que sejam considerados muito mais presentes no dia-a-dia do que outrora, inclusive sendo a causa de algumas enfermidades (Hall-Stoodley et al. 2004). Assim, a revisão das concentrações inibitórias/microbicidas mínimas estabelecidas para os agentes químicos tornou-se fundamental, uma vez que os ensaios padrão para determinar a concentração de uso de um sanificante não consideram o microrganismo na forma de biofilmes, mas apenas como células planctônicas, mais suscetíveis (Toté et al. 2010). Logo, é provável que a concentração recomendada de uso dos agentes químicos seja alterada para mais, elevando o consumo dessas substâncias.

Além disso, é grande a demanda por produtos para o controle microbiológico cujos mecanismos de ação sejam distintos dos sanificantes tradicionais, devido à preocupante realidade da resistência microbiana. Considerando também que a presença de biofilmes maduros em indústrias de alimentos é frequente, este trabalho teve o objetivo de avaliar a ação de sanificantes e óleos essenciais, isolados ou em combinação, frente a células planctônicas e biofilmes já estabelecidos, simulando uma condição de higienização repetitiva e visando a uma possível redução na concentração

do sanificante necessária para a erradicação dos biofilmes. Assim, este trabalho destaca-se por ser um dos pioneiros a avaliar, tanto a ação de óleos essenciais combinados com sanificantes, quanto a eventual ação que concentrações sub-inibitórias dos óleos poderiam exercer ao longo de três dias consecutivos de tratamento sobre o mesmo biofilme.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

Para a realização dos ensaios, foi utilizada uma cepa de *Pseudomonas* sp. isolada de biofilme em resfriador de expansão para leite cru após o procedimento de higienização (Flach et al. 2014). A cepa destacou-se dos demais isolados por ser produtora de lipase, protease e apresentar moderada capacidade de formar biofilmes *in vitro*. A cepa foi estocada a -20°C em Caldo Triptona de Soja (TSB – Himedia) suplementado com 25% de glicerol.

Óleos Essenciais

Foram testados óleos essenciais comercialmente disponíveis de orégano (*Origanum vulgare* - Ferquima) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* – Dierberger). A determinação de seus principais componentes foi realizada através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, por Ugalde (2014). Os principais componentes do óleo essencial de orégano foram, respectivamente: carvacrol, para-cimeno e gama-terpineno. Para o óleo de alecrim, os três principais componentes foram, respectivamente: bornil-acetato, 1,8-cineol e cânfora. As concentrações dos óleos testadas encontram-se na Tabela 1.

Sanificantes

Os sanificantes ácido peracético e hipoclorito de sódio foram adquiridos da empresa Topglass e diluídos conforme a necessidade imediatamente antes da realização dos ensaios. O pH da solução de ácido peracético, quando diluído a 4% em solução salina, em caldo LB suplementado com 0,5% de tween 20 ou em caldo LB não suplementado foi de, respectivamente: 2,6; 3,2 e 3,2. As concentrações dos sanificantes testadas encontram-se na Tabela 1.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima para Células Planctônicas (MBC_p) frente a Sanificantes e Óleos Essenciais

O teste foi realizado em microplacas de poliestireno com 96 cavidades, conforme Adukwu et al. (2012), com modificações. A cepa de *Pseudomonas* sp. foi inoculada em ágar Luria-Bertani (LBA - DIFCO) e subcultivada por duas vezes em 30°C, para ativação das células. Após, foi efetuada uma suspensão de células em solução salina (NaCl 0,9%) com turbidez visualmente comparada à escala 0,5 de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). O inóculo inicial adicionado a cada cavidade foi de 5×10^6 UFC/mL, idêntico ao utilizado no teste de formação de biofilmes, descrito abaixo. Os sanificantes e óleos essenciais foram diluídos serialmente com base 2 em caldo LB suplementado com 0,5% de tween 20, totalizando 150 µL em cada cavidade.

Foram utilizados controles de crescimento (inóculo inicial em LB com 0,5% de tween 20), de esterilidade (meio de cultura estéril) e dos sanificantes/óleos testados (maior concentração testada, dissolvida em meio de cultura estéril), com incubação em 30°C/24h. A contagem do inóculo inicial foi efetuada em *plate count agar* (PCA – Acumedia) e a densidade ótica (DO) de cada cavidade determinada em leitor de microplacas (EL800 Biotek Instruments, INC.) com λ de 490 nm antes e após as 24h de incubação.

Após a incubação, 10 µL de cada cavidade tratada foram inoculados em placas de ágar PCA para a determinação da MBC_b (incubação de 24h em 30°C). Então, após inspeção visual, cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC - SIGMA) foi adicionado a cada cavidade, na concentração final de 10% (Klancnik et al. 2010), com incubação de 30 minutos em 30°C, no escuro. A redução do TTC, resultante do metabolismo microbiano, confere coloração rósea às cavidades com células viáveis e facilita a determinação da CIM. A DO das cavidades foi novamente determinada após a adição do TTC.

A CIM correspondeu à menor concentração do agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível da cepa (CLSI 2003). Foi estabelecida por inspeção visual e, esta, comparada com a DO das cavidades antes e após a adição de TTC. Já a MBC_p

correspondeu à menor concentração do agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível nas placas (Jadhav et al. 2013; Vázquez-Sánchez et al. 2014, com modificações).

Cultivo dos Biofilmes para os Desafios

Foi adaptado de Harrison et al. (2010). A cepa de *Pseudomonas* sp. foi inoculada em LBA e subcultivada por duas vezes em 30°C, para ativação das células. Após, foi efetuada uma suspensão de células em solução salina (NaCl 0,9%) com turbidez comparada à escala 0,5 de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A suspensão de células foi diluída em caldo LB visando a obtenção do inóculo inicial com 5×10^6 UFC/mL (150 µL/cavidade). O inóculo inicial foi submetido à contagem em placas pelo método *drop plate* em ágar PCA, sendo inoculados 10 µL de cada diluição seriada em duplicata.

Todas as etapas transcorridas entre a suspensão de células e o preenchimento da microplaca foram efetuadas em um período máximo de 30 min, para evitar alterações na contagem atribuídas ao crescimento celular. A microplaca foi incubada em 30°C/24h, sem agitação. A DO das cavidades foi determinada antes e após o período de incubação.

No dia seguinte, antes de dar prosseguimento aos testes, foi efetuada a contagem das colônias contidas nas placas de PCA. Visando à padronização da formação do biofilme, o inóculo inicial não poderia apresentar contagem inferior ou superior a 1 log da estabelecida (5×10^6 UFC/mL). Caso isso ocorresse, os demais testes não eram efetuados e o experimento deveria ser reiniciado.

Em todos os testes efetuados, foi também realizada a contagem de células planctônicas após 24h de incubação: 20 µL do meio de cultura das cavidades destinadas ao controle de crescimento foram diluídos serialmente em solução salina. Placas de ágar PCA foram inoculadas, em duplicata, com 10 µL de cada diluição pelo método *drop plate* (30°C/18-24h).

Verificação da Padronização dos Biofilmes Formados pela Cepa

Foi efetuada somente uma vez para a cepa em estudo (Harrison et al., 2010), com o intuito de confirmar a inexistência de crescimento assimétrico dos biofilmes nas diferentes regiões da microplaca. Foram dispensados 150 µL do inóculo inicial em 3

grupos de quatro cavidades, localizadas nas laterais e no centro da microplaca. Transcorridas 24h em 30°C, foi realizada a enumeração de células planctônicas em ágar PCA (*drop plate*). Após, o líquido das cavidades com biofilme foi aspirado e as mesmas lavadas duas vezes com solução salina, mantendo a solução por 1 minuto na microplaca a cada lavagem. Após, as cavidades foram preenchidas com 200 µL de LB e submetidas a um banho de ultrassom (Transsonic T310, ELMA. Germany; 35kHz) durante 10 min para desalojar as células. Foi realizada a contagem em PCA de cada cavidade (idêntica à contagem de planctônicos) para quantificar o biofilme formado.

O resultado das contagens dos biofilmes nos três diferentes locais da microplaca avaliados foi analisado estatisticamente. Para que o biofilme fosse considerado padronizado/simétrico (e, portanto, tivesse reprodutibilidade), o resultado das contagens não deveria apresentar diferença significativa ($p > 0,05$). O mesmo teste foi realizado também com as contagens de planctônicos, visando comparar o crescimento da cepa nos diferentes locais da microplaca.

Um experimento paralelo visando confirmar a eficácia do banho de ultrassom em desalojar os biofilmes também foi realizado. Após o cultivo do biofilme, nas mesmas condições descritas acima, foi efetuada a contagem de células planctônicas. Imediatamente após, a microplaca foi submetida à sonicação por 10 min e, após, as mesmas cavidades tiveram novamente efetuada a enumeração de células planctônicas.

Determinação da Concentração Mínima para Erradicação de Biofilme (MBEC) e da Concentração Bactericida Mínima para Biofilmes (MBC_b)

Após 24h de contato das células com a microplaca, o meio de cultura das cavidades foi aspirado e as mesmas lavadas duas vezes com solução salina, mantendo a solução por 1 minuto na microplaca a cada lavagem. Então, as cavidades foram tratadas durante 10 minutos com os sanificantes ou com os óleos essenciais isoladamente. Foi também avaliado o efeito do ácido peracético combinado com os óleos essenciais em concentrações sub-inibitórias (Tabela 1). Cada condição foi testada em quadruplicata. Os controles foram lavados duas vezes com solução salina e tratados por 10 minutos com caldo LB estéril suplementado com 0,5% de tween 20. Uma situação real enfrentada pela indústria de alimentos é a higienização repetitiva (diária ou, geralmente, com intervalos menores) de locais onde, eventualmente, haja biofilmes já formados.

Assim, o efeito do tratamento com o ácido peracético e os óleos essenciais, isoladamente ou em combinação, foi realizado durante três dias consecutivos sobre o mesmo biofilme.

Transcorridos os 10 min de contato dos sanificantes/óleos, estes foram aspirados, as cavidades lavadas duas vezes com solução salina (200 μ L) e preenchidas com 200 μ L de LB estéril (meio de recuperação). Então, a microplaca foi submetida a um banho de ultrassom (Transsonic T310, ELMA. Germany; 35kHz) durante 10 min para desalojar as células. Foi realizada a contagem em PCA de cada cavidade do controle de crescimento (método *drop plate*) para quantificar o biofilme não submetido ao tratamento (controle), bem como a leitura da DO de todas as cavidades. Imediatamente após a sonicação, 10 μ L de cada cavidade tratada foram inoculados em placas de ágar PCA para a determinação da MBC_b (30°C/24h). Após, a microplaca foi novamente incubada em 30°C/24h.

Após, foi determinada a MBC_b , definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível nas placas de PCA (Jadhav et al. 2013; Vázquez-Sánchez et al. 2014, com modificações). Através de inspeção visual e leitura da DO da microplaca, foi também estabelecida a MBEC. Esta é definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível da bactéria no meio de recuperação (Harrison et al. 2010). Todas as etapas - incluindo a leitura da DO a cada intervalo de 24h, a contagem de células sésseis após o tratamento e o estabelecimento da MBC_b e da MBEC - foram realizadas durante três dias consecutivos.

A DO média das cavidades correspondentes a cada tratamento foi utilizada para calcular o percentual de remoção do biofilme pelo tratamento, da seguinte forma: $100 - [(DO_{490nm}$ da cavidade tratada/ DO_{490nm} do controle de crescimento) x 100], conforme Jadhav et al. (2013).

Avaliação da Remoção/Desalojamento do Biofilme pelos Sanificantes/Óleos Essenciais com Cristal Violeta

Finalizados os três dias consecutivos do tratamento, as cavidades foram submetidas ao ensaio de quantificação do biofilme/matriz remanescente com cristal violeta (Stepanovic et al. 2000, com modificações). Basicamente, o meio de

recuperação foi aspirado, as cavidades lavadas duas vezes com 200 μL de solução salina, as células foram fixadas com metanol (99%, 200 $\mu\text{L}/15$ min) e, depois de secas, coradas com 200 μL de solução de cristal violeta (2%; 5 min). O corante foi lavado em água potável até seu completo desprendimento da microplaca. Após a secagem da microplaca, foram adicionados 200 μL de ácido acético glacial (33%) para solubilização do corante remanescente. Em seguida, foi determinada a DO das cavidades, conforme descrito acima.

Tabela 1: Concentrações de sanificantes e óleos essenciais testadas. Todos foram diluídos em caldo LB suplementado com 0,5% de tween 20 (adaptado de Adukwu et al. 2012).

Sanificante/óleo	Concentrações testadas
Ácido peracético	CIM e MBC_p (% v/v): de 1,0 a 0,001 (diluição com base 2) MBEC e MBC_b (% v/v): 4, 2, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75 0,5, 0,25 e 0,1
Hipoclorito de sódio	CIM e MBC_p (% v/v): de 1,0 a 0,001 (diluição com base 2) MBEC e MBC_b (% v/v): 4, 2, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75 0,5, 0,25 e 0,1
Óleo essencial de alecrim	CIM e MBC_p ($\mu\text{L}/\text{mL}$): de 16,0 a 0,25 (diluição com base 2) MBEC e MBC_b ($\mu\text{L}/\text{mL}$): de 16,0 a 0,01 (diluição com base 2)
Óleo essencial de orégano	CIM e MBC_p ($\mu\text{L}/\text{mL}$): de 1,0 a 0,003 (diluição com base 2) MBEC e MBC_b ($\mu\text{L}/\text{mL}$): de 16,0 a 0,01 (diluição com base 2)
Ácido peracético/ alecrim	Ácido peracético (% v/v): 4, 2, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75 0,5, 0,25 e 0,1 Óleo essencial de alecrim ($\mu\text{L}/\text{mL}$): 1,0
Ácido peracético/ orégano	Ácido peracético (% v/v): 4, 2, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75 0,5, 0,25 e 0,1 Óleo essencial de orégano ($\mu\text{L}/\text{mL}$): 0,125

Foram calculados a média e o desvio padrão da DO do controle de esterilidade, sendo o ponto de corte (DOc) estabelecido como três desvios-padrão acima da média do controle de esterilidade. Foram classificadas como “biofilme remanescente ausente” as cavidades com $\text{DO} \leq \text{DOc}$; “biofilme remanescente reduzido”, as com $\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$; “biofilme remanescente moderado” as cavidades com $2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$ e “biofilme remanescente em grande quantidade” as com $4 \times \text{DOc} < \text{DO}$ (Stepanovic et al. 2000).

Avaliação Microscópica da Remoção/Desalojamento de Biofilmes

A avaliação microscópica foi realizada com o intuito de confirmar a presença de biofilme após o tratamento com ácido peracético. Para eliminar a possível interferência do caldo LB suplementado com 0,5% de tween 20, o ácido peracético foi diluído a 4% também em LB sem tween e em solução salina. A ação do hipoclorito de sódio a 4% em LB com 0,5% de tween 20 também foi avaliada. Biofilmes de 24h formados em microplacas para microscopia (Greiner Bio-One, Germany), tratados por 10 min (30°C) com os sanificantes e não submetidos à sonicação, foram observados em microscopia de escaneamento confocal a *laser* (Olympus FV1000) utilizando o software Olympus Fluoview (versão 4.0). As amostras foram coradas com 0,1% (m/v) de laranja de acridina em solução PBS (pH 7,4) por 5 min, conforme Harrison et al. (2006). Foram obtidas ao menos três imagens de cada condição.

Análise Estatística

Para verificação da padronização da formação de biofilmes e do crescimento da cepa em diferentes locais da microplaca, foi utilizada ANOVA (valores corrigidos através de divisão por 10^6). Para avaliar a eficácia do banho de ultrassom em desalojar os biofilmes formados, foi realizado o teste t pareado. Todas as análises estatísticas deste estudo foram efetuadas junto ao Núcleo de Assessoria Estatística (NAE – UFRGS) utilizando o Software SPSS, versão 18.0.

RESULTADOS

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no crescimento da cepa e em sua formação de biofilmes nos diferentes locais da microplaca. Já na comparação das contagens do biofilme efetuadas antes e após a sonicação por 10 min, houve diferença ($p < 0,05$), indicando que o processo estava sendo eficiente, tanto para desalojar as células, quanto para permitir sua recuperação do meio de cultura.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da CIM e MBC_p , para sanificantes e óleos essenciais, isolados ou em combinação. Os resultados da MBEC e MBC_b determinadas durante três dias consecutivos são apresentados na Tabela 3. Foram testados frente ao biofilme de *Pseudomonas* sp. o ácido peracético isoladamente ou

combinado com óleos essenciais em concentrações sub-inibitórias. Diferentes concentrações de cada óleo essencial e do hipoclorito de sódio isoladamente também foram testadas. Os valores de MBEC e MBC_b foram idênticos e são apresentados em conjunto. A MBEC e MBC_b para o hipoclorito de sódio foram determinadas somente para o biofilme de 24h. Não houve divergências na determinação da CIM e MBEC quando comparadas as determinações por inspeção visual, DO e coloração conferida pelo TTC.

Verifica-se que o crescimento em biofilmes elevou a tolerância da cepa aos sanificantes em 33,3 e 16,7 vezes para o ácido peracético e o hipoclorito de sódio, respectivamente. A Figura 1 indica o percentual de remoção de biofilme obtido para cada tratamento ao longo de três dias consecutivos.

Tabela 2: Valores de CIM e MBC_p para os sanificantes e óleos essenciais testados frente a células de *Pseudomonas* sp. na forma planctônica.

	Ácido peracético (% v/v)	Hipoclorito de sódio (% v/v)	Óleo de orégano (µL/mL)	Óleo de alecrim (µL/mL)
CIM	≤0,015	≤0,03	≤0,25	≤0,5
MBC _p	≤0,015	≤0,03	≤4,0	≤8,0

Tabela 3: Valores de MBEC e MBC_b determinados para cada um dos três dias consecutivos de tratamento.

Tratamento	MBEC e MBC _b		
	Dia 1 ^a	Dia 2 ^b	Dia 3 ^c
Ácido peracético	≤0,5%	≤0,5%	≤0,5%
Hipoclorito de sódio	≤0,5%	nd	nd
Ácido peracético + orégano (0,125 µL/mL)	≤0,5%	≤0,5%	≤0,5%
Ácido peracético + alecrim (1 µL/mL)	≤0,5%	≤0,5%	≤0,5%
Só Orégano	≤16 µL/mL	≤16 µL/mL	≤16 µL/mL
Só Alecrim	>16 µL/mL	>16 µL/mL	>16 µL/mL

^a Biofilme: $7,2 \times 10^6$ UFC/cm²; ^b Biofilme: 9×10^6 UFC/cm²; ^c Biofilme: $4,5 \times 10^7$ UFC/cm². nd: não determinado.

Foi intrigante a ausência de percentuais de remoção do biofilme próximos de 100% (Figura 1), considerando que o cálculo de remoção do biofilme após os

tratamentos com sanificantes/óleos essenciais já considera a DO do próprio meio de cultura. Além disso, a DO do controle com sanificante (4%) foi similar à DO do controle de esterilidade. Assim, optou-se por quantificar a eventual presença de biofilme residual nas cavidades da microplaca utilizando cristal violeta, cujos dados são evidenciados nas Figuras 2 e 3.

Nas Figuras 2 e 3, a DO média do controle de crescimento foi de 0,33. Já a DO média das cavidades correspondentes aos controles de esterilidade, dos óleos de alecrim e orégano, bem como do ácido peracético na máxima concentração utilizada ficou abaixo de 0,065, demonstrando que os óleos essenciais, o caldo LB e o sanificante não promoveram a retenção de corante nas cavidades e que esta pode estar relacionada à presença de biofilme.

A retenção do corante cristal violeta nas cavidades tratadas com ácido peracético a 4% em diferentes diluentes – caldo LB, LB com 0,5% de tween 20 e solução salina – foi bastante similar (dados não mostrados) e justificou a realização da microscopia de escaneamento confocal a laser, cujo resultado é apresentado na Figura 4. Nesta análise foi verificada a presença de biofilme residual após o tratamento com ácido peracético, independente do diluente utilizado. Por outro lado, o hipoclorito de sódio removeu/desalojou quase que completamente o biofilme, nas mesmas condições de teste (diluente, tempo de contato, concentração) do ácido peracético.

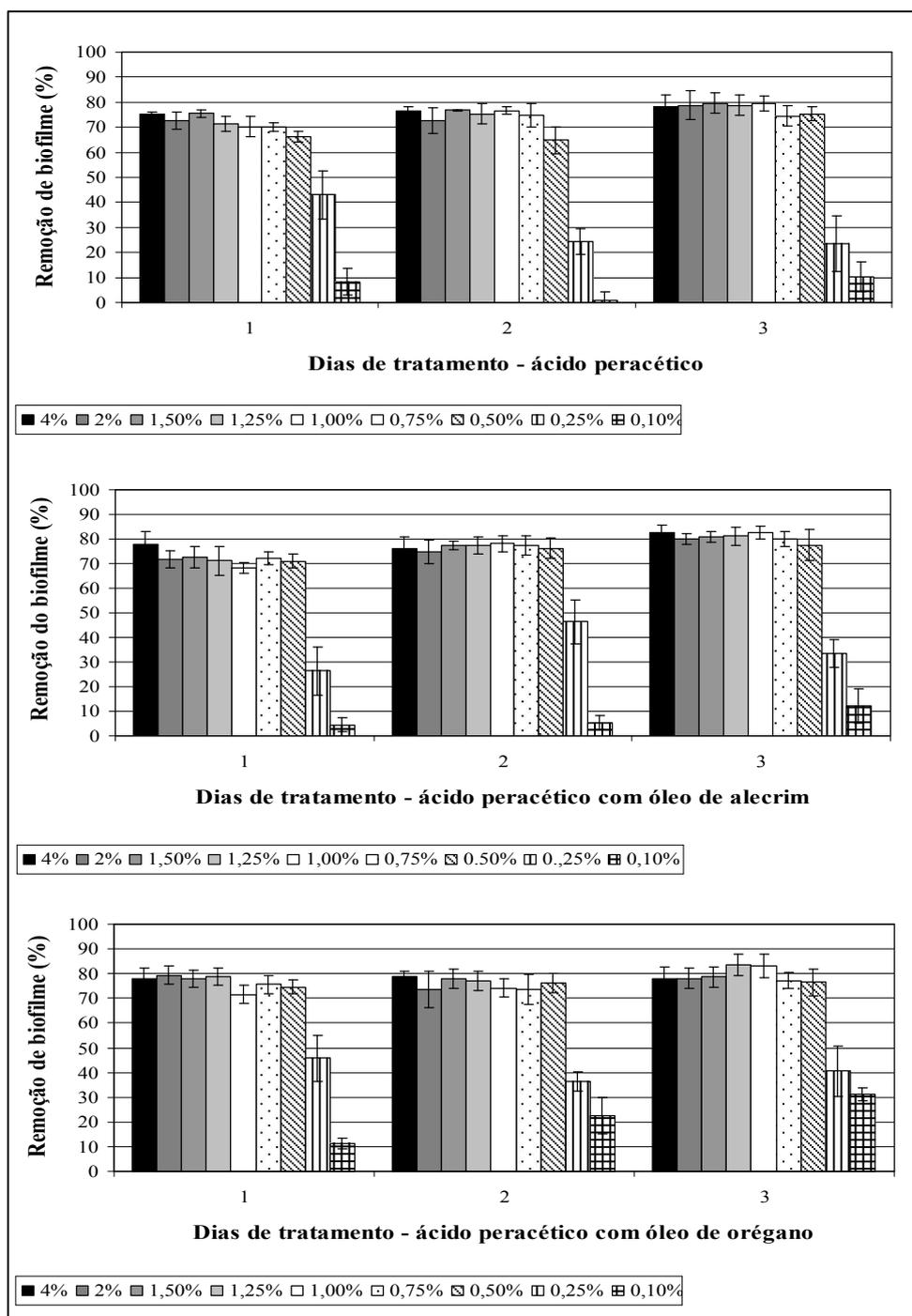


Figura 1: Percentual de remoção do biofilme de *Pseudomonas* sp. após o tratamento (10 min) com ácido peracético (concentrações de 4% a 0,10%) isoladamente ou combinado com óleo essencial de alecrim (1 μ L/mL) e orégano (0,125 μ L/mL) durante três dias consecutivos. Após cada tratamento diário, o biofilme foi lavado duas vezes com solução salina, coberto com LB estéril, sonificado e a microplaca re-incubada por 24h. A concentração de $\leq 0,5\%$ correspondeu à MBEC e à MBC_b para todos os tratamentos/dias. Dados baseados na DO do meio de cultura após incubação.

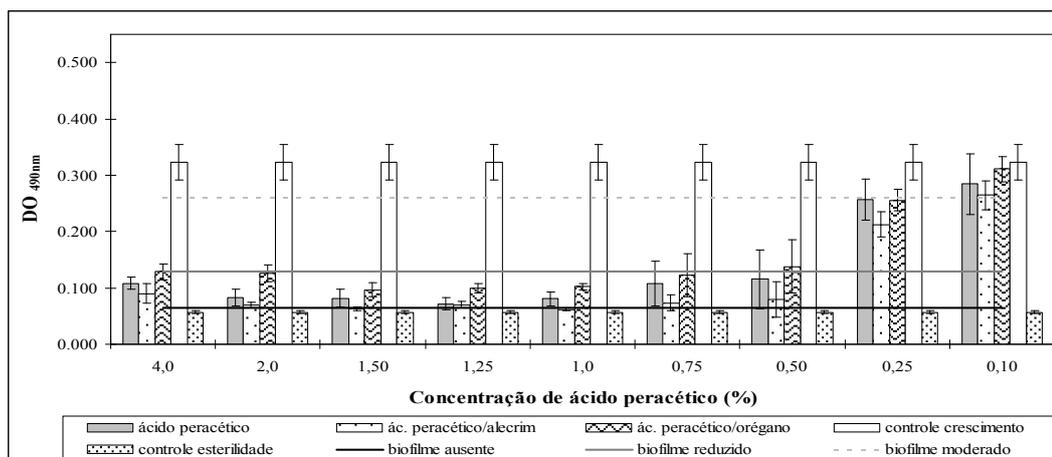


Figura 2: Quantificação por densidade ótica do biofilme remanescente nas cavidades após o terceiro dia consecutivo de tratamento com ácido peracético isoladamente ou em combinação com óleos essenciais de alecrim e orégano. Após a determinação da MBEC ($\leq 0,5\%$ para todas as combinações), as cavidades foram lavadas duas vezes com solução salina, fixadas com metanol, coradas com solução de cristal violeta (2%) ressolubilizado em ácido acético. As linhas horizontais representam os pontos de corte para a categorização do biofilme remanescente. Cavidades com valores de DO acima do ponto de corte para “biofilme moderado” foram classificadas como “biofilme remanescente em grande quantidade”.

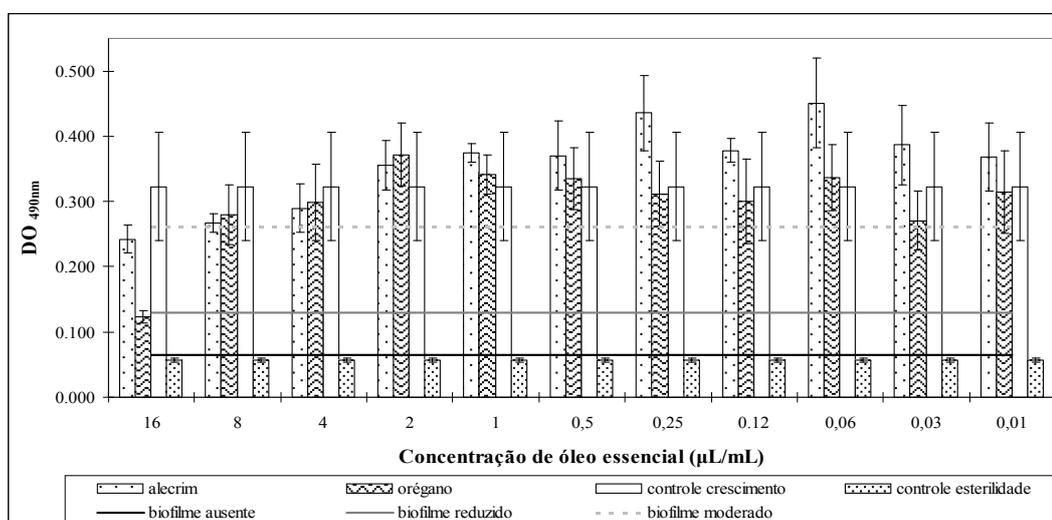


Figura 3: Quantificação por densidade ótica do biofilme remanescente nas cavidades após o terceiro dia consecutivo de tratamento com óleo essencial de alecrim e orégano, isoladamente. Após a determinação da MBEC ($\leq 16\mu\text{L}/\text{mL}$ para orégano e $>16\mu\text{L}/\text{mL}$ para alecrim), as cavidades foram lavadas duas vezes com solução salina, fixadas com metanol, coradas com solução de cristal violeta (2%) ressolubilizado em ácido acético. As linhas horizontais representam os pontos de corte para a categorização do biofilme remanescente. Cavidades com valores de DO acima do ponto de corte para “biofilme moderado” foram classificadas como “biofilme remanescente em grande quantidade”.

DISCUSSÃO

Klancnik et al. (2010), compararam os métodos de disco-difusão, diluição em ágar, microdiluição e macrodiluição em caldo para a determinação da CIM e concluíram que o teste de microdiluição em caldo utilizando sais de tetrazólio (TTC ou INT) era a melhor alternativa para avaliar diversos extratos com rapidez, justificando a escolha do método para a determinação da CIM neste trabalho. No presente estudo a determinação da CIM a partir de inspeção visual, antes e após a adição de TTC não apresentou divergências. Ainda assim, recomenda-se o uso do TTC, pois a alteração de cor provocada por sua redução é um indicativo de viabilidade celular, parâmetro não detectado pela densidade ótica.

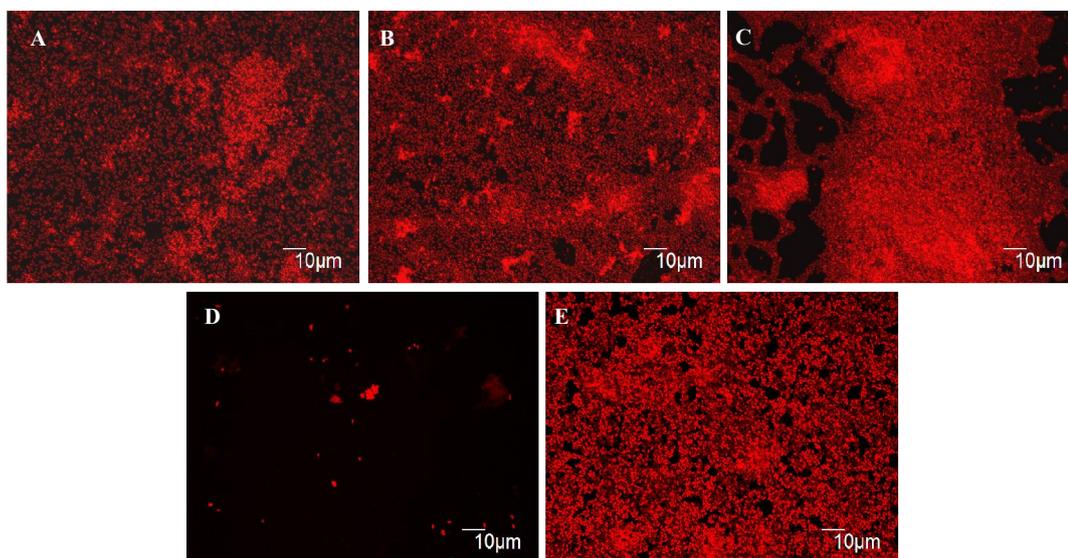


Figura 4: Observação em microscopia confocal do biofilme de 24h tratado com sanificantes a 4% por 10 min em 30°C. A: ácido peracético diluído em LB com 0,5% de tween 20; B: ácido peracético diluído em LB sem tween; C: ácido peracético diluído em solução salina (NaCl 0,9%); D: hipoclorito de sódio diluído em LB com 0,5% de tween 20; E: biofilme não submetido ao tratamento (controle).

A CIM avalia a resistência de células planctônicas, enquanto que a MBEC avalia a tolerância do biofilme ao sanificante (Harrison et al., 2010). Assim, verificou-se que no presente estudo o crescimento em biofilmes elevou consideravelmente a tolerância do microrganismo aos sanificantes (33,3 vezes para o ácido peracético e 16,7 vezes para o hipoclorito de sódio). Simões et al. (2010) mencionam que a tolerância dos biofilmes

aos sanificantes eleva-se de 10 a 1000 vezes, em comparação ao crescimento planctônico, corroborando este resultado. Além disso, como a tolerância aos sanificantes também costuma elevar-se em biofilmes multi-espécie – os comumente encontrados em indústrias de alimentos – é possível que a concentração recomendada de uso dos sanificantes em situações reais seja ainda maior (Simões et al., 2009; Behnke et al., 2011; Ibusquiza et al., 2012).

É importante mencionar também que os conceitos e consequentes determinações da MBC_b e MBC_p foram mais restritivos do que os padrões do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2003), cujas diretrizes são a principal referência para testes com antimicrobianos de uso clínico. A CLSI define MBC como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de matar 99,9% da população inicial de bactérias, ou 3,0 na escala \log_{10} (Harrison et al. 2010). Neste estudo, adotou-se a determinação de MBC conforme Jadhav et al. (2013, com modificações) e Vázquez-Sánchez et al. (2014, com modificações), pois mais se aproxima dos padrões microbiológicos recomendados para as superfícies em contato com alimentos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS; 30 UFC/cm²) e pela American Public Health Association (APHA; 2 UFC/cm²) (Downes e Ito 2001).

Nas Figuras 2 e 3, verifica-se, que o material retido nas cavidades após a adição de cristal violeta não pode ser atribuído a resíduos de sanificante/óleo essencial, nem tampouco ao meio de cultura utilizado. Tal resultado é complementado pela Figura 1, na qual o percentual de remoção de biofilmes pelo ácido peracético também não atingiu os 100%, mesmo nas concentrações de sanificante superiores à MBEC/ MBC_b e, portanto, sem crescimento. Além disso, a microscopia de contraste de fase confirmou a presença de células embebidas em matriz após cada um dos três dias de tratamento (dados não mostrados).

O resultado da análise estatística das contagens bacterianas realizadas antes e após a sonicação por 10 min indica que o processo foi eficaz na remoção/desalojamento dos biofilmes ($p < 0,05$). Entretanto, é possível que não tenha sido capaz de removê-lo completamente. Disso, destacam-se duas principais consequências: (i) a contagem celular do biofilme estabelecido nas microplacas pode estar subestimada. (ii) A retenção de cristal violeta nas placas em que houve a formação de biofilmes estaria justificada. Porém, a retenção de corante ocorreu em todas as cavidades tratadas com ácido

peracético, sendo reduzida, mas detectável, nas concentrações iguais ou superiores à MBC_b estabelecida (0,5%; Figura 2).

A microscopia confocal (Figura 4) confirma a retenção de células/matriz inclusive após o tratamento com ácido peracético na elevada concentração de 4%, em biofilmes de 24h não submetidos à sonicação. Por outro lado, o hipoclorito de sódio foi capaz de remover o biofilme de forma satisfatória, na mesma concentração. Kumar e Anand (1998) mencionam que tanto o hipoclorito de sódio, quanto o ácido peracético são fortes agentes oxidantes, capazes inclusive de despolimerizar a matriz de exopolissacarídeos e facilitar o desalojamento/remoção dos biofilmes. Porém, Souza et al. (2014), considerando imagens em microscopia eletrônica de varredura, verificaram que o hipoclorito de sódio e o ácido peracético em concentrações bem inferiores às testadas aqui (250 mg/L e 30 mg/L, respectivamente) não conseguiram desalojar completamente os biofilmes de *Staphylococcus aureus*. Toté et al. (2010), também verificaram que hipoclorito de sódio (5%) e ácido peracético (0,3%) inativaram satisfatoriamente as células de *P. aeruginosa*, mas somente o primeiro foi capaz de desalojar/remover o biofilme. Assim, a concentração de hipoclorito testada parece contribuir para o maior efeito de desalojamento dos biofilmes.

Outro aspecto que precisa ser considerado é a forma de apresentação e a concentração do sanificante testado. Sanificantes comerciais à base de ácido peracético costumam variar não apenas na concentração do princípio ativo, mas também na formulação do produto. Sabe-se que a dificuldade de penetração de um sanificante na matriz do biofilme é uma das principais causas de redução de eficácia (Beer et al. 1994). Agentes complexantes, tensoativos, dentre outros encontrados em formulações comerciais podem, eventualmente, facilitar a penetração do sanificante e, conseqüentemente, reduzir sua MBEC. Neste trabalho, optou-se por testar o ácido peracético p.a., visando favorecer a comparação dos resultados com trabalhos relacionados, independentemente da marca/formulação avaliada. Além disso, considerando que as indústrias de alimentos devem avaliar a eficiência do processo de sanitização em seus programas de higienização, as concentrações de uso dos sanificantes comerciais indicadas pelo fabricante acabam por ser validadas ou não a partir das necessidades individuais de cada indústria. Como demonstram os resultados

encontrados pela microscopia confocal, nenhum dos diluentes testados tornou satisfatório o desalojamento do biofilme pelo ácido peracético.

Resíduos do biofilme (matriz, células mortas) remanescentes da higienização atuam não apenas como fonte de nutrientes para os microrganismos, mas também como condicionadores de superfície, alterando suas propriedades físico-químicas e, eventualmente, favorecendo a adesão celular. A etapa de limpeza (remoção dos resíduos utilizando detergentes), quando bem executada, é capaz de desalojar até mais de 90% dos microrganismos associados à superfície (Simões et al. 2010). Embora conste em qualquer programa de higienização da indústria de alimentos, a limpeza tem, muitas vezes, sua relevância subestimada na prática, considerando a utilização de sanificantes potentes na etapa subsequente. Neste estudo, a limpeza dentro do processo de higienização tem sua importância reforçada, pois sua má execução pode resultar na aceleração do estabelecimento de biofilmes entre os intervalos da higienização.

A combinação do ácido peracético com os óleos essenciais não alterou a MBEC/MBC_b determinadas para a cepa, nem tampouco reduziu o biofilme formado (Figura 2). Aliás, a adição do óleo de orégano proporcionou uma elevação considerável do biofilme quantificado (concentrações de 0,5% a 4% de ácido peracético). Uma vez que essas concentrações de ácido peracético estão acima da MBEC/MBC_b, descarta-se a hipótese do óleo ter sido metabolizado pela cepa. Embora necessite de estudos mais detalhados, outra hipótese seria a de que o óleo tenha dificultado a remoção do biofilme pelo sanificante, talvez formando uma camada protetora sobre o mesmo. Porém, é importante mencionar que este aumento na recuperação do biofilme, com exceção da concentração de 0,5%, não alterou a classificação do tratamento na quantificação com cristal violeta, ou seja: nas concentrações mencionadas, tanto o sanificante isolado, quanto o em combinação com o óleo de orégano tiveram o biofilme remanescente categorizado como “quantidade reduzida”. Na concentração de 0,5% a combinação do sanificante com o óleo de orégano alterou sua classificação para “biofilme remanescente moderado”, mas sua DO média foi similar a do tratamento com ácido peracético isoladamente.

Quando os óleos foram testados isoladamente (Figura 3), a concentração de 16µL/mL de óleo de alecrim (abaixo da MBEC para o óleo) afetou negativamente a capacidade da cepa em formar biofilme, sendo o resultado da quantificação do biofilme

divergente do controle (“biofilme moderado” e “grande quantidade”, respectivamente). Talvez, devido à elevada concentração, tenha havido a retenção de óleo essencial em porções hidrofóbicas da matriz do biofilme, apesar de o mesmo ter sido solubilizado em caldo LB suplementado com tween e das sucessivas lavagens com solução salina ao longo dos três dias de experimento. Caso isso tenha ocorrido, é possível que, após cada tratamento diário, seguido de desalojamento das células com ultrassom e reincubação da microplaca por mais 24h, o processo de formação do biofilme tenha ocorrido na presença de pequenas concentrações remanescentes do óleo essencial.

O efeito inibitório de alguns óleos essenciais na formação de biofilmes é conhecido (Szczepanski e Lipski 2014) e poderia explicar a redução do biofilme formado nas cavidades tratadas com óleo de alecrim após três dias de tratamento, em comparação com o controle. Por outro lado, algumas concentrações sub-inibitórias de óleo essencial (Figura 3) parecem ter afetado positivamente a formação do biofilme, embora também sem divergências na quantificação do biofilme remanescente quando comparadas ao controle. Nesse caso, é possível que o óleo em baixas concentrações tenha sido utilizado como fator de crescimento para a cepa, como também já observado por Sandasi et al. (2008) para óleos essenciais testados em *Listeria monocytogenes*.

CONCLUSÃO

A combinação de sanificantes com óleos essenciais, embora não tenha apresentado resultados satisfatórios nas condições testadas é uma ampla e promissora alternativa para estudos futuros, tanto para retardar a formação dos biofilmes, quanto para erradicar os já estabelecidos.

Este trabalho destacou a importância da apresentação do sanificante (concentração, diluente utilizado, presença de outros componentes) como sendo um aspecto fundamental a ser considerado, tanto no programa de higienização da indústria, quanto na comparação de trabalhos similares. Reforça também a necessidade da microscopia e/ou da quantificação de biofilme residual com cristal violeta para confirmar, não apenas a inativação das células, como também seu desalojamento (remoção) da superfície. Inclusive, sugere-se que o termo “remoção” seja utilizado

somente em trabalhos que avaliaram o desalojamento do biofilme e não como sinônimo de morte celular.

A etapa de limpeza de equipamentos tem sua importância destacada, pois contribui de maneira fundamental para a higienização de uma superfície colonizada, bem como na prevenção da formação e do estabelecimento de biofilmes nos intervalos entre as higienizações.

REFERÊNCIAS

Adukwu EC, Allen SCH, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J. appl. microbiol.* 2012; 113: 1217-1227.

Azeredo GA, Stamford TLM, Nunes PC, Neto NJG, Oliveira MEG, Souza EL. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Res. Int.* 2011; 44: 1541-1548.

Behnke S, Parker AE, Woodall D, Camper AK. Comparing the Chlorine Disinfection of Detached Biofilm Clusters with Those of Sessile Biofilms and Planktonic Cells in Single- and Dual-Species Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(20): 7176–7184.

Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms during Disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60(12): 4339-4344.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 1822-1828.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI Formerly NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 6th Ed. Wayne: The Institute; 2003; Document M7-A6, 81p.

Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA); 2001.

Flach J, Grzybowski V, Toniazzo G, Corção G. Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. *Food Sci. Technol.* 2014; 34(3): 571-576.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 95-108.

Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat. Protoc.* 2010; 5(7): 1236-1254.

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, et al. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol. Proced. Online.* 2006; 8(1): 194-215.

Ibusquiza PS, Herrera JJR, Vázquez-Sánchez D, Cabo ML. Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. *Food Control.* 2012; 25: 202-210.

Jadhav S, Shah R, Bhave M, Palombo EA. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control.* 2013; 29: 125-130.

Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. Microbiol. Methods.* 2010; 81: 121–126.

Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 42: 9–27.

Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. biodeterior. biodegrad.* 2003; 51:249–253.

Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crop. Prod.* 2014; 62: 250–264.

Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control.* 2008; 19: 1070–1075.

Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* 2009; 20: 407-413.

Simões M, Simões LC, Vieira MJ. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res.* 2009; 43: 229–237.

Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 2010; 43: 573- 583.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*. 2000; 40: 175- 179.

Souza EL, Meira QGS, Barbosa IM, Athayde AJAA, Conceição ML, Siqueira Júnior JP. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Braz. J. Microbiol.* 2014; 45(1): 67-75.

Srey S, Jahid IK, Ha S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013; 31: 572-585.

Szczepanski S, Lipski A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*. 2014; 36: 224-229.

Toté K, Horemans T, Berghe DV, Maes L, Cos P. Inhibitory Effect of Biocides on the Viable Masses and Matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(10): 3135–3142.

Ugalde ML. Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais [Thesis]. Erechim (RS): Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões; 2014.

Vázquez-Sánchez D, Cabo ML, Ibusquiza PS, Rodríguez-Herrera JJ. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. *Food Control*. 2014; 39: 8-16.

3.3. Artigo 3: Atuação de óleos essenciais e 2(5H)-furanona na formação de biofilmes por *Pseudomonas* sp.

Artigo a ser submetido para o Periódico *Journal of Applied Microbiology*.

Atuação de óleos essenciais e 2(5H)-furanona na formação de biofilmes por *Pseudomonas* sp.

Juliana Flach¹, Raíza de Almeida Mesquita², Mariane Lobo Ugalde^{2,4}, Rogério Luis Cansian², Geciane Toniazco², Gertrudes Corção³

1 – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA-UFRGS). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS - Campus Erechim - Erechim - RS - Brasil.

2 - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Campus Erechim - Erechim - RS - Brasil.

3 - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - Porto Alegre - RS - Brasil.

4 - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha - Campus Júlio de Castilhos –Júlio de Castilhos – RS, Brasil.

Óleos e furanona sobre biofilmes.

Correspondência: Gertrudes Corção, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Sarmiento Leite, 500 - CEP: 90050-170 - Porto Alegre - RS - Brasil. Telefone/Fax: (xx 51) 3308-4111. E-mail: corcao@ufrgs.br

Resumo

Objetivo: Avaliar a atuação de seis óleos essenciais e de uma furanona no processo de formação de biofilmes de uma cepa de *Pseudomonas* sp.

Métodos e resultados: Os óleos essenciais e a furanona tiveram a CIM para uma cepa de *Pseudomonas* sp. determinada por microdiluição em caldo LB suplementado com tween 20. O biofilme formado nas microplacas foi quantificado com cristal violeta e as melhores condições de ensaio observadas em microscopia confocal. O óleo de orégano apresentou a melhor ação antimicrobiana. Porém, o óleo de alecrim foi o que mais inibiu a formação de biofilmes pela cepa, talvez através da interferência no sistema de *quorum sensing*. Os óleos de *Citrus* sp. não apresentaram ação antimicrobiana, nem inibição da formação de biofilme ($p > 0,05$), com exceção da mandarina verde (concentração de $1\mu\text{L}/\text{mL}$). A 2(5H)-furanona, em concentrações sub-inibitórias, favoreceu expressivamente a formação de biofilmes.

Conclusões: Os óleos de orégano e alecrim são alternativas promissoras para o controle de microrganismos, sendo o último, também interferente no processo de formação de biofilmes.

Significância e impacto do estudo: *Pseudomonas* sp. é um dos mais importantes deterioradores de alimentos e um excelente colonizador de superfícies. Neste trabalho, o óleo de alecrim, em concentrações sub-inibitórias (0,250, 0,50 e $1,0\mu\text{L}/\text{mL}$) foi capaz de interferir na formação de biofilme de uma cepa nativa desse gênero, revelando-se um promissor candidato à impregnação de superfícies que entram em contato com alimentos.

Palavras-Chave: Alecrim, orégano, laranja, mandarina, tangerina, *quorum sensing*.

Introdução

Biofilmes microbianos são agregados de células embebidas em matriz polimérica e aderidos a uma superfície. São estruturas dinâmicas e seu processo de

formação está diretamente relacionado a um sistema de comunicação microbiana dependente da densidade populacional, denominado *quorum sensing*. Trata-se de um sistema mediado por moléculas chamadas de auto-indutores bacterianos que se acumulam no meio e, quando atingem determinadas concentrações, ativam ou reprimem a expressão gênica das células próximas (Keller e Surette 2006). É através desse sistema que as bactérias conseguem monitorar e responder a suas próprias densidades populacionais. A transição da fase de microcolônias para a fase de maturação do biofilme, sua manutenção e diversos outros aspectos da vida microbiana são dependentes do *quorum sensing* (Simões et al. 2010).

Devido a sua importância, diversos organismos eucarióticos desenvolveram formas de interferir, positiva ou negativamente no *quorum sensing* microbiano. Um dos primeiros a ser identificado foi a macroalga *Delisea pulchra*, a qual produz furanonas que mimetizam quimicamente auto-indutores do tipo N-acil-homoserina lactonas (AHLs) e interferem na comunicação microbiana (Givskov et al. 1996).

Na indústria de alimentos, biofilmes nos equipamentos e na própria superfície dos alimentos, acarretam na maior tolerância dos microrganismos aos sanificantes, em contaminação biológica e na redução da vida de prateleira dos produtos. É consenso que a melhor estratégia para o combate aos biofilmes concentra-se na prevenção de sua formação. Entretanto, sabe-se que nessa modalidade de indústria o processo de formação de biofilmes ocorre em poucas horas, dificultando seu controle (Meyer 2003; Shi e Zhu 2009).

Paralelamente à dificuldade em controlar biofilmes, está a tendência de mercado em substituir total ou parcialmente os aditivos alimentares sintéticos e, inclusive os compostos derivados de sódio, conservante amplamente utilizado em alimentos. Nesse

contexto, surge como alternativa promissora o uso de óleos essenciais, misturas complexas de metabólitos secundários de plantas, com propriedades aromáticas, antimicrobianas, antioxidantes, dentre diversas outras (Szabó et al. 2010; Teixeira et al. 2013; Raut e Karuppayil 2014). A Food and Drug Administration dos EUA (FDA) já classificou diversos óleos essenciais ou seus componentes como GRAS, *Generally Recognized as Safe* (Hyldgaard et al. 2012). Bakkali et al. (2008), Hyldgaard et al. (2012) e Raut e Karuppayil (2014) fazem excelentes revisões sobre a ação, isolada ou sinérgica, de óleos essenciais e seus principais componentes. Já Burt (2004) revisa as potenciais aplicações dos óleos essenciais, discriminando-as também por categoria de produto alimentar. Além disso, o Brasil é um dos principais produtores mundiais de óleos essenciais (Raut e Karuppayil 2014).

Os óleos essenciais são produzidos pela planta em resposta ao ambiente, sendo a diversidade ou as proporções dos componentes de seu óleo essencial um reflexo direto das condições de cultivo. Destacam-se, assim, os óleos essenciais extraídos de plantas cultivadas em condições orgânicas, ou com adubação orgânica (Teles et al. 2014). A diversidade de compostos presentes nos óleos essenciais faz com que estes tenham mais de um modo de ação sobre as células microbianas, dificultando a aquisição de resistência e, inclusive, atuando sobre cepas resistentes a antimicrobianos (Bakkali et al 2008; Raut e Karuppayil 2014).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atuação de seis óleos essenciais (orégano, alecrim, laranja, tangerina, mandarina verde e mandarina vermelha) e de uma furanona (2(5H)-furanona) no processo de formação de biofilmes por uma cepa de *Pseudomonas* sp.

Material e Métodos

Microrganismo

Os ensaios foram realizados utilizando uma cepa de *Pseudomonas* sp. isolada de resfriador de expansão para leite cru recém-higienizado, formadora moderada de biofilmes, com potencial para deterioração enzimática do leite (é produtora de lipases e proteases), conforme Flach et al. (2014). Foi estocada a -20°C em Caldo Triptona de Soja (TSB – Himedia) suplementado com 25% de glicerol.

Óleos essenciais

Foram testados os seguintes óleos essenciais: Orégano (*Origanum vulgare* – Ferquima); Alecrim (*Rosmarinus officinalis* - Dierberger); Laranja (*Citrus sinensis* - Ecocitrus); Tangerina (*Citrus reticulata* - Ecocitrus); Mandarina verde (*Citrus deliciosa* - Ecocitrus) e Mandarina vermelha (*Citrus deliciosa* - Ecocitrus). O óleo de alecrim, devido aos resultados apresentados, foi caracterizado quimicamente através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa por Ugalde (2014). Seus três principais componentes foram, respectivamente: bornil-acetato, 1,8-cineol e cânfora.

Os óleos essenciais foram diluídos em caldo Luria-Bertani (LB) contendo diferentes concentrações de tween 20 (Tabela 1).

Furanona

Foi avaliada a ação de 2(5H)-furanona (SIGMA) na formação de biofilmes. A furanona foi diluída em caldo Luria-Bertani (LB) suplementado ou não com tween 20 (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações testadas dos óleos essenciais e 2(5H)-furanona, bem como a concentração de tween 20 correspondente.

<i>Concentrações dos óleos essenciais testados ($\mu\text{L}/\text{mL}$)</i>	<i>Concentração de tween 20 correspondente (% v/v)</i>	<i>Concentrações de 2(5H)-furanona* testadas (% v/v)</i>
16,0	0,250	4,0
8,0	0,1250	2,0
4,0	0,0625	1,0
2,0	0,0313	0,50
1,0	0,0156	0,25
0,50	0,0078	0,1250
0,250	0,0039	0,0625
0,1250	0,0020	0,0313
0,0625	0,0010	0,0156
0,0313	0,0005	0,0078
0,0156	0,0002	--

* A 2(5H)-furanona foi também testada, nas mesmas concentrações, em caldo LB sem tween 20.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Óleos Essenciais e 2(5H)-furanona

Foi realizada em microplacas de poliestireno de 96 cavidades, com modificações aos protocolos de Adukwu et al. (2012) e Szczepanski e Lipski (2014). Tween 20 (máxima concentração = 0,25%) e os óleos essenciais (máxima concentração = 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$) foram diluídos serialmente na microplaca (base 2), até alcançarem as concentrações de 0,0002% e 0,0156 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. 2(5H)-furanona (máxima concentração = 4%) e tween 20 foram diluídos (base 2) até alcançarem as concentrações

de 0,0078% e 0,0005%, respectivamente. O volume final de cada cavidade foi de 150 μL . Adicionalmente, a 2(5H)-furanona foi testada, nas mesmas concentrações, dissolvida em caldo LB sem tween 20. Caldo LB suplementado com 0,25% de tween 20 foi utilizado como controle de esterilidade. Controles do crescimento da cepa em caldo LB e em caldo LB com tween 20 (concentrações de tween idênticas às testadas com os óleos) também foram estabelecidos.

Após dois repiques consecutivos da cepa estoque em ágar Luria-Bertani (LBA), com incubação em 30°C/24h, foi elaborada uma suspensão de células em solução salina (NaCl 0,9% m/v), com turbidez visualmente comparada à escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A concentração final de células em cada cavidade foi de 5×10^6 UFC/mL, confirmada por contagem em placas de *plate count agar* (PCA - Acumedia) por *drop plate* (duas gotas de 10 μL). A microplaca e as placas de ágar PCA foram incubadas em 30°C/24h. No dia seguinte, foi efetuada a leitura do ágar PCA para confirmação do número de células inoculadas, o qual deveria estar no limite de 5×10^6 UFC/mL $\pm 1 \log_{10}$ para que fosse dada continuidade ao experimento (Harrison et al., 2010). Após, a CIM dos óleos essenciais e da 2(5H)-furanona foi estabelecida por inspeção visual da microplaca, bem como através da leitura de densidade ótica (DO) em leitor de microplacas (EL800 Biotek Instruments, INC.) com $\lambda = 490 \text{ nm}$.

Estabelecida a CIM, foi efetuada a contagem de células planctônicas dos controles de crescimento com e sem tween (*drop plate*, conforme descrito anteriormente). Das cavidades destinadas ao controle de esterilidade, 10 μL do meio de cultura foram inoculados em ágar PCA para confirmação da condição e as placas incubadas em 30°C/24h.

Quantificação do biofilme formado utilizando cristal violeta

Após a determinação da CIM e das respectivas contagens celulares, o meio de cultura das cavidades foi aspirado e as mesmas lavadas duas vezes com solução salina, mantendo a solução por 1 minuto na microplaca a cada lavagem, para remoção de planctônicos.

Em seguida, as cavidades foram submetidas ao ensaio de quantificação do biofilme com cristal violeta (Stepanovic et al. 2000, com modificações). O biofilme das cavidades foi fixado (15 min) com 200 μ L metanol (99%) e, depois de seco, corado com 200 μ L de solução de cristal violeta para Gram (5 min). O corante foi lavado em água da tratada até seu completo desprendimento da microplaca. Após a secagem da microplaca, foram adicionados 200 μ L de ácido acético glacial (33%) para solubilização do corante remanescente. Em seguida, foi determinada a DO das cavidades em leitor de microplacas, conforme descrito no item anterior.

Foram calculados a média e o desvio padrão da DO do controle de esterilidade, sendo o ponto de corte (DOc) estabelecido como três desvios-padrão acima da média do controle de esterilidade. Foram classificadas como “ausência de biofilme” as cavidades com $DO \leq DOc$; “biofilme reduzido”, as com $DOc < DO \leq 2 \times DOc$; “biofilme moderado” as cavidades com $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ e “biofilme em grande quantidade” as com $4 \times DOc < DO$ (Stepanovic et al. 2000).

Microscopia de escaneamento confocal a laser

As principais condições de teste, determinadas a partir do resultado da quantificação do biofilme com cristal violeta, foram reproduzidas em microplacas para microscopia (Greiner Bio-One, Germany). As amostras foram coradas com 0,1% (m/v)

de laranja de acridina em solução PBS (pH 7,4) por 5 min, conforme Harrison et al. (2006). Em seguida, as microplacas foram observadas em microscópio confocal a *laser* (Olympus FV1000), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME/UFRGS). Foram obtidas ao menos três imagens de cada condição, visualizadas utilizando o software Olympus Fluoview (versão 4.0).

Análise estatística

A formação de biofilmes na presença dos óleos foi comparada aos controles com e sem tween (sendo a DO destes também comparada entre si) através de ANOVA com correção múltipla de médias por Tukey. Na concentração de 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$, a formação de biofilmes junto aos óleos de alecrim e orégano apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na homogeneidade de variâncias. Neste caso, os dados foram analisados por ANOVA com correção múltipla de médias por Tamhane. As análises foram realizadas junto ao Núcleo de Assessoria Estatística (NAE – UFRGS) utilizando o Software SPSS, versão 18.0.

Resultados

A Figura 1 apresenta o resultado da CIM e da quantificação do biofilme formado na presença dos óleos essenciais. A inibição do crescimento planetônico (CIM) para o óleo de orégano ocorreu entre 0,250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 0,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$; já, para o óleo de alecrim, ocorreu entre 4,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

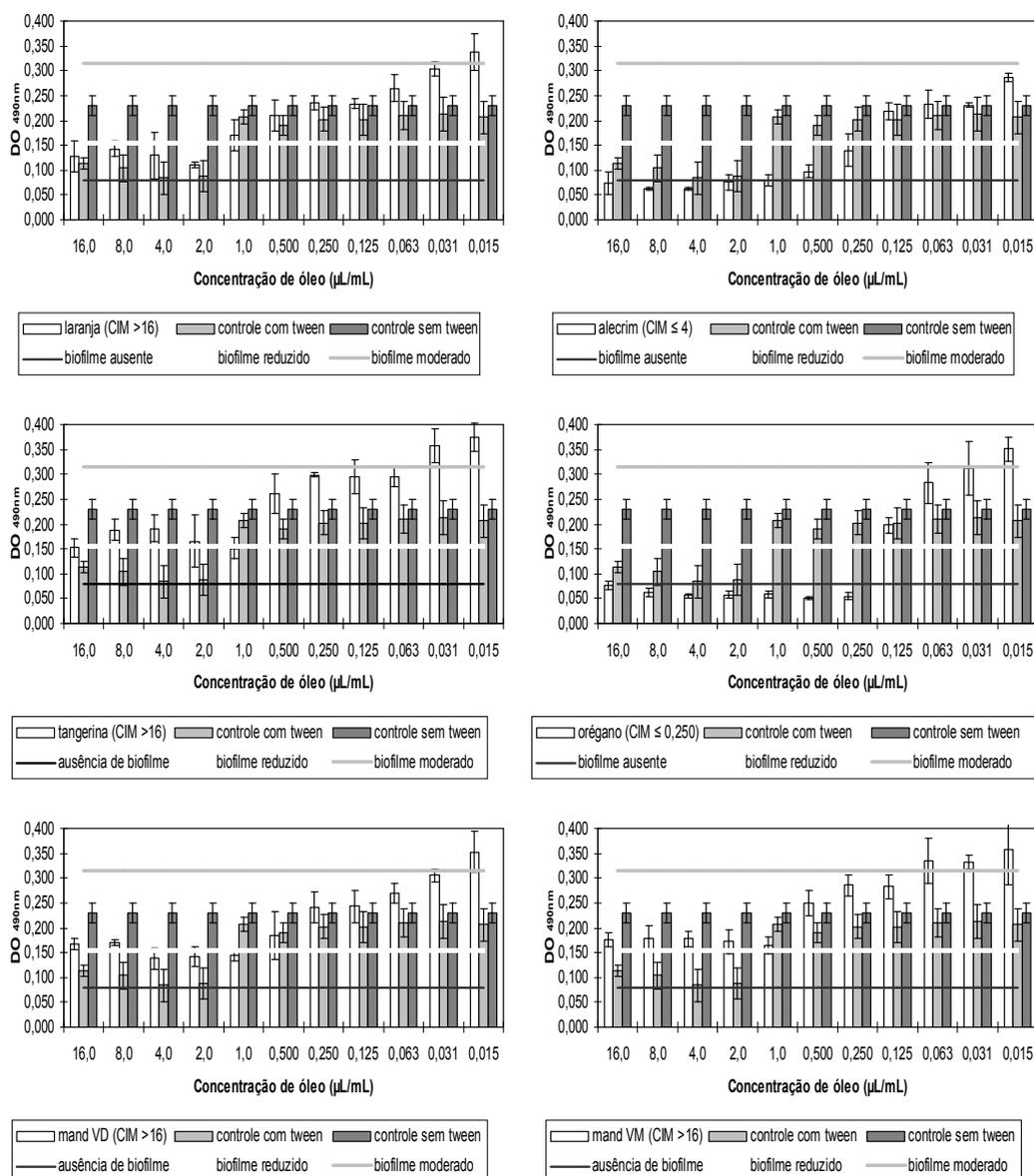


Figura 1: Quantificação com cristal violeta do biofilme de *Pseudomonas* sp. formado na presença de diferentes óleos essenciais após 24h de incubação estática em 30°C. Os controles sem tween (caldo LB) e com tween (tween 20 em concentrações idênticas à acrescentadas aos óleos) também são apresentados. As linhas horizontais representam os limites para a categorização do biofilme em “ausente”, “reduzido” ou “moderado” e foram estabelecidas a partir da DO do controle de esterilidade. DOs acima do limite de “biofilme moderado” são consideradas como “biofilme em grande quantidade”. Mand VD: mandarina verde; mand VM: mandarina vermelha.

A presença do detergente tween 20 afetou a formação de biofilmes e o crescimento da cepa. Porém, concentrações de tween inferiores a 0,0156% (correspondente à concentração de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de óleo), não apresentaram mais diferença significativa ($p > 0,05$) na formação de biofilmes, quando comparados os controles com e sem tween (Figura 1).

O óleo de alecrim destacou-se por inibir significativamente ($p < 0,05$) a formação de biofilmes nas concentrações sub-inibitórias de 1,0, 0,50 e 0,250 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Na concentração sub-inibitória de 2,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o óleo não diferiu significativamente ($p < 0,05$) do controle com tween, possivelmente devido à interferência negativa da concentração do detergente no crescimento da cepa (Figura 2). O óleo de mandarina verde reduziu o biofilme significativamente ($p < 0,05$) somente na concentração sub-inibitória de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Os demais óleos não apresentaram efeito inibitório significativo sobre a formação do biofilme, embora o óleo de orégano tenha apresentado a melhor ação antimicrobiana (CIM entre 0,250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 0,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

A Figura 2 apresenta os resultados da CIM e da formação de biofilmes pela cepa na presença de 2(5H)-furanona. A inibição do crescimento planctônico (CIM) para a furanona ocorreu entre 0,063% e 0,031%. A Figura 3 apresenta os resultados da microscopia confocal das principais condições de teste do óleo de alecrim e da 2(5H)-furanona.

Todos os óleos essenciais e também a 2(5H)-furanona, quando testados em concentrações muito baixas, favoreceram a formação dos biofilmes, possivelmente sendo utilizados como nutriente pela cepa (Fig. 1 e 2). Cabe ressaltar também que concentrações sub-inibitórias de 2(5H)-furanona não afetaram a formação de biofilmes pela cepa, apresentando, inclusive, efeito contrário (Fig. 2 e 3).

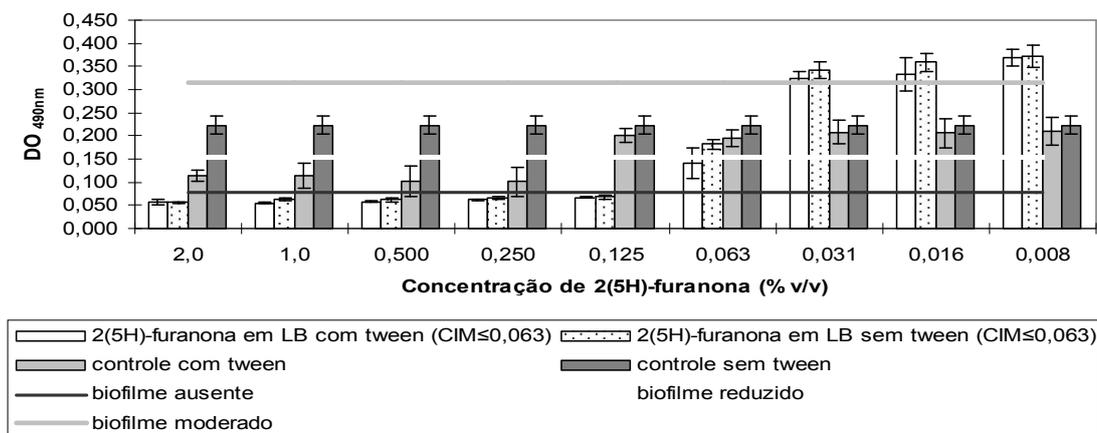


Figura 2: Quantificação com cristal violeta do biofilme de *Pseudomonas* sp. formado na presença de 2(5H)-furanona após 24h de incubação estática em 30°C. Os controles sem tween (caldo LB) e com tween (caldo LB com tween 20 em concentrações idênticas às acrescentadas à furanona) também são apresentados. As linhas horizontais representam os limites para a categorização do biofilme em “ausente”, “reduzido” ou “moderado” e foram estabelecidas a partir da DO do controle de esterilidade. DOs acima do limite de “biofilme moderado” são consideradas como “biofilme em grande quantidade”.

A microscopia confocal confirmou os resultados da quantificação dos biofilmes com cristal violeta. Verifica-se que a colonização da superfície na presença do óleo essencial de alecrim foi menor, mais plana e com quantidade reduzida de matriz, quando comparada aos controles sem óleo (Fig. 3, A-F). Mesmo nas concentrações que não afetaram o crescimento da cepa, a presença de tween parece ter afetado a estrutura do biofilme formado (Fig. 3, A-C; G).

A furanona parece ter permitido uma colonização mais expressiva da superfície, embora também de maneira menos organizada do que o controle (Fig. 3, G-I). O tween não favoreceu essa elevação na formação do biofilme, uma vez que quantificação com cristal violeta similar foi obtida após o crescimento da cepa em caldo LB com furanona, mas sem tween (Fig.2).

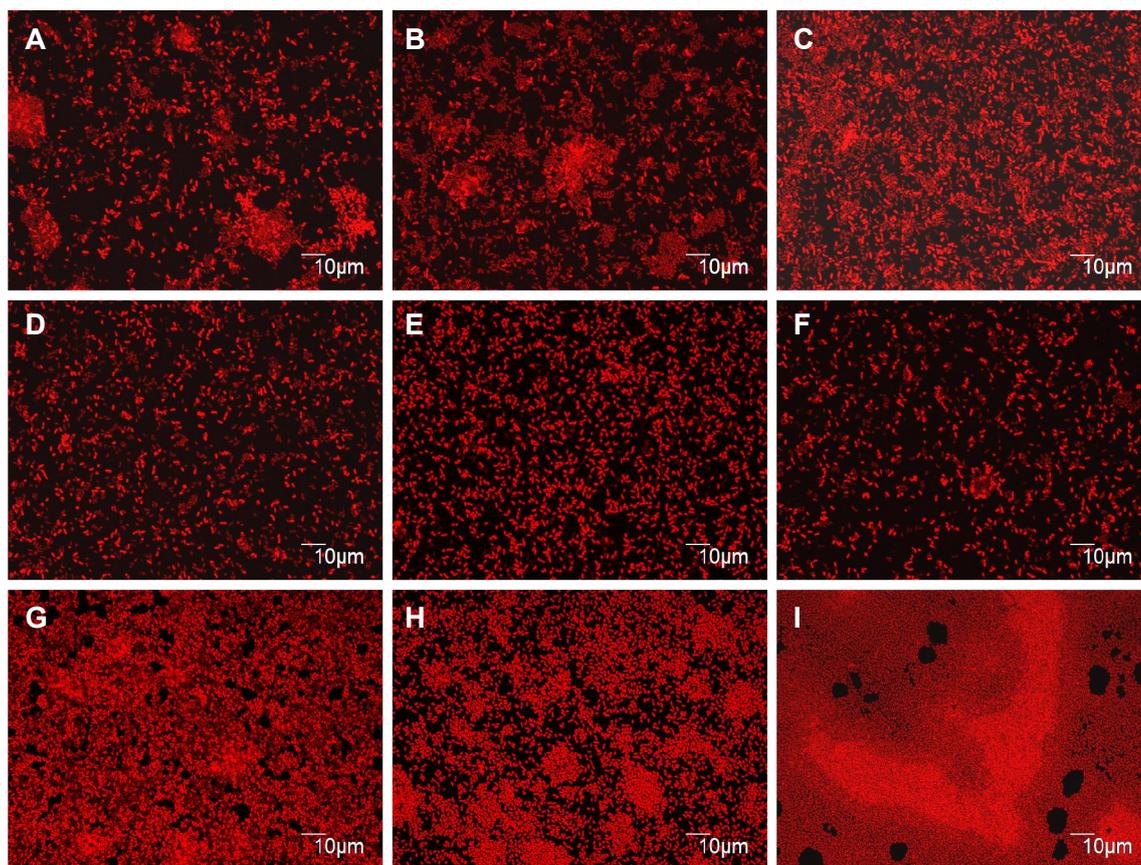


Figura 3: Observação em microscopia confocal das principais condições de teste de óleo de alecrim e de 2(5H)-furanona. **A-C:** biofilmes controle formados por 24h em caldo LB suplementado com tween 20 nas concentrações de 0,0625%, 0,0078% e 0,0039%, respectivamente. **D-F:** óleo de alecrim nas concentrações de 4 µL/mL (CIM), 0,5 µL/mL e 0,25 µL/mL, respectivamente (a concentração de tween corresponde, respectivamente a 0,0625%, 0,0078% e 0,0039%). **G:** biofilme controle formado por 24h em caldo LB sem tween. **H-I:** 2(5H)-furanona nas concentrações de, respectivamente, 0,06% (CIM) e 0,03% (a concentração de tween corresponde, respectivamente a 0,0078% e 0,0039%).

Discussão

Nas concentrações testadas neste trabalho, somente dois dos seis óleos essenciais testados foram capazes de afetar o crescimento da cepa: os óleos de alecrim e de orégano. O óleo de orégano, apesar de ter a melhor ação antimicrobiana, não interferiu negativamente na formação de biofilmes pela cepa quando em concentrações sub-

inibitórias. Szczepanski e Lipski (2014) em seu trabalho com *Sphingomonas*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*, encontraram ação antimicrobiana similar a do presente trabalho quando avaliaram o óleo de orégano. Entretanto, concentrações sub-inibitórias do óleo inibiram a formação de biofilmes e o tween 20 não interferiu no crescimento das cepas, embora tenha afetado a formação dos biofilmes de *Sphingomonas* e *Acinetobacter*. Gutierrez et al. (2009) também destacaram o orégano por sua ação antimicrobiana contra microrganismos de importância em alimentos.

Os óleos essenciais derivados de plantas do gênero *Citrus* sp. são mundialmente os mais produzidos. Fisher e Phillips (2008), em sua revisão, mencionam diversos trabalhos em que óleos essenciais de *Citrus* apresentaram bons resultados. No presente trabalho, nenhum deles inibiu a cepa de *Pseudomonas* sp. (CIM >16 µL/mL), resultado corroborado por Hammer et al. (1999) cuja determinação de CIM para sete espécies do gênero *Citrus* – incluindo as aqui testadas – frente a *P. aeruginosa* ficou acima dos 20µL/mL. Raut e Karuppayil (2014), em sua revisão, comentam que *P. aeruginosa* tende a ser mais tolerante aos óleos essenciais quando comparada a outros microrganismos. Além disso, características intrínsecas da cepa testada pode interferir no resultado (Fischer et al. 2007), justificando também divergências entre as conclusões de diferentes trabalhos.

O envolvimento do *quorum sensing* na formação de biofilmes por *P. aeruginosa* foi descrito em 1998, por Davies et al. Por consequência, trabalhos que estudam a ação de óleos essenciais sobre o processo de formação de biofilmes microbianos, buscando identificá-los como interferentes nesse sistema de comunicação vem sendo desenvolvidos em um período relativamente recente (Szabó et al. 2010).

Algas marinhas como *Delisea pulchra* produzem mais de 30 tipos de furanonas com a finalidade de impedir o estabelecimento de biofilmes microbianos em sua superfície (Kuehl et al. 2009). O estudo dessa classe de moléculas revelou que são quimicamente similares a moléculas de sinalização celular (autoindutores) do sistema *quorum sensing*, ou seja: interferem na comunicação microbiana e, conseqüentemente, na formação de biofilmes, ao competir pelos mesmos sítios de ligação dos autoindutores. Algumas furanonas que interferem no *quorum sensing* não atuam nos estágios iniciais de colonização da superfície, mas sim, alterando a arquitetura do biofilme ou favorecendo o desalojamento celular (Davies et al. 1998; Hentzer et al. 2002).

A escolha de 2(5H)-furanona para os testes teve o intuito de observar a formação de biofilmes na presença de uma molécula conhecidamente interferente no *quorum sensing* e compará-la (por quantificação e microscopia) com a ação de óleos essenciais, visando identificar uma eventual interferência nesse sistema de comunicação. Surpreendentemente, verificou-se que a cepa de *Pseudomonas* sp. testada não teve a formação de biofilmes negativamente afetada pela furanona, apesar de esta ter uma pronunciada ação antimicrobiana ($CIM \leq 0,063\%$). Aliás, talvez a elevada toxicidade da molécula tenha afetado sua avaliação como interferente do sistema *quorum sensing* no processo de formação de biofilmes. Em baixas concentrações, de maneira similar ao que ocorreu com alguns dos óleos essenciais testados, a furanona, aparentemente, foi utilizada como fator de crescimento pela cepa.

Shobharani e Agrawal (2010), verificaram a atuação de 2(5H)-furanona como conservante em laticínios, controlando o crescimento de *Pseudomonas* sp. e outros gêneros, corroborando nosso resultado sobre a toxicidade da molécula. Já, Ponnusamy

et al. (2010) avaliaram a ação da 2(5H)-furanona na inibição da formação de biofilmes por *Aeromonas hydrophila* e concluíram que algumas concentrações sub-inibitórias (< 1mg/mL) não apenas reduziram o biofilme formado como, inclusive, apresentaram a inibição do *quorum-sensing* mediado por diversas N-acil-homoserina lactonas (AHLs), moléculas de sinalização em Gram-negativos. Por outro lado, Kuehl et al. (2009) testando um derivativo de furanona [(5Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-butil-2(5H)-furanona], constataram que a molécula, também em concentrações sub-inibitórias, favoreceu o estabelecimento do biofilme formado por *S. aureus*, de maneira similar ao que ocorreu no presente trabalho.

O teste de moléculas derivadas de 2(5H)-furanona (furanona 56: <10 µg/mL - Hentzer et al., 2002; furanona C30: ~2,5 µg/mL - Hentzer et al., 2003) demonstra que houve redução do biofilme formado por *Pseudomonas aeruginosa*, espécie de *Pseudomonas* sp. em que o *quorum sensing* está mais estudado. Nesses casos, porém, além da variação nas moléculas testadas, a espécie de *Pseudomonas* sp. poderia justificar eventuais divergências na ação da furanona. Aqui, a espécie de *Pseudomonas* não foi determinada, mas é muito provável que não seja *P. aeruginosa*, pois esta não constitui microbiota predominante de equipamentos para resfriamento de leite, sendo mais comuns as espécies *P. fluorescens*, *P. fragi*, dentre outras.

Sabe-se que furanonas costumam interferir na comunicação mediada por AHL (autoindutor 1) em bactérias como *Pseudomonas* sp. Porém, é importante destacar que esse não é o único circuito de comunicação possível. El-Mowafy et al. (2014) verificaram que a aspirina reduz significativamente a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e tem interação com sítios de ligação similares aos da furanona C30. Porém, no mesmo trabalho, *E. coli*, outro Gram-negativo, apresentou resultados insatisfatórios,

atribuídos a formas diversas de comunicação dessa espécie, como a via do sistema autoindutor 2. A explicação da inabilidade de 2(5H)-furanona em reduzir o biofilme formado no presente trabalho necessita da identificação de espécie de *Pseudomonas* sp. em estudo e, dependendo da espécie, de sua melhor caracterização do *quorum-sensing*.

Por outro lado, a reduzida formação de biofilmes pela cepa de *Pseudomonas* sp. na presença de concentrações sub-inibitórias de óleo de alecrim revela um comportamento que talvez possa estar associado à interferência no *quorum-sensing*. A colonização superficial apresentada após 24h na presença do óleo de alecrim assemelha-se à colonização ocorrida no intervalo entre 2h a 8h de contato da cepa com a microplaca em caldo LB sem óleo e sem tween (dados não mostrados). Inclusive, comparando as imagens da colonização superficial na presença do óleo de alecrim deste trabalho (Fig. 3: D-F) com estudos em que a interferência no *quorum-sensing* foi comprovada (Packiavathy et al. 2012; Kerekes et al. 2013), verifica-se que apresentam similaridade, tanto na redução da colonização, quanto na estrutura plana, não diferenciada e com reduzida biomassa do biofilme. No trabalho de Szabó et al. (2010), que reforça essa hipótese, o óleo de alecrim foi um dos mais potentes inibidores de *quorum-sensing* mediado por AHLs, interferindo na comunicação, mas não no crescimento de cepas indicadoras.

Jiang et al. (2011) verificaram que o óleo de alecrim inibiu *P. aeruginosa* na concentração de 0,1% (v/v), bem abaixo da CIM aqui estabelecida e uma possível razão poderia ser também a composição do óleo testado. A variação da composição química de um mesmo óleo essencial é comum e até mesmo esperada, pois diversos fatores são capazes de afetá-la, como o cultivo da planta, colheita, métodos de secagem, extração e armazenamento. Entretanto, cabe mencionar que os três principais componentes

encontrados no presente trabalho (bornil-acetato, 1,8-cineol, e cânfora, respectivamente) também foram apontados nos estudos de Szumny et al. (2010), corroborando nossos resultados.

Além da tradicional aplicação como aromatizantes, os óleos essenciais poderiam também ser mais utilizados como conservantes, no condicionamento de superfícies que entram em contato com os alimentos, ou impregnados em embalagens, visando retardar a formação de biofilmes. Talvez os principais entraves para essas aplicações sejam a concentração necessária para a eficácia em nível de alimento (geralmente muito maior do que a estabelecida *in vitro*) e a provável alteração sensorial decorrente da aplicação (Burt 2004; Fisher et al. 2007). Entretanto, a expansão da área de desenvolvimento de novos produtos da indústria e o maior conhecimento sobre a atuação dos óleos essenciais e seus componentes, certamente tornarão mais comuns as inovações nesse sentido.

Em resumo, os óleos de *Citrus* sp. não apresentaram ação antimicrobiana, nem inibição da formação de biofilme nas concentrações testadas, com exceção de uma concentração de mandarina verde. Apesar de o óleo de orégano ter apresentado a melhor ação antimicrobiana, o óleo de alecrim, em diversas concentrações sub-inibitórias, foi quem mais inibiu a formação de biofilmes pela cepa, possivelmente através da interferência no sistema de *quorum-sensing*. Assim revela-se um promissor candidato à impregnação de superfícies que entram em contato com alimentos, podendo retardar a colonização microbiana e, talvez até seja capaz de não interferir no aspecto sensorial dos alimentos, devido às baixas concentrações em que atua.

Na execução de outros trabalhos, caso os óleos essenciais sejam diluídos em tween 20, recomenda-se o uso de baixas concentrações do mesmo, para que não haja

interferência no crescimento da cepa. Para a cepa de *Pseudomonas* sp. testada neste trabalho, concentrações abaixo de 0,0156% (v/v) são as indicadas.

A 2(5H)-furanona favoreceu a formação de biofilmes pela cepa, também em concentrações sub-inibitórias. A possibilidade da espécie estudada não ser *P. aeruginosa* (para a qual a furanona tem comprovada ação inibitória na formação de biofilmes), talvez implique na presença de circuitos de comunicação/receptores diversos, capazes de justificar a má atuação da molécula nesse processo celular.

Agradecimentos

À ECOCITRUS pela doação dos óleos essenciais.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não apresentam conflito de interesse.

Referências

Adukwu, E.C, Allen, S.C.H. and Phillips, C.A. (2012) The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J appl Microbiol* **113**, 1217-1227.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* **46**, 446–475.

Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 223– 253.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Sci* **280**, 295-298.

El-Mowafy, S.A., Galil, K.H.A.E., El-Messery, S.M. and Shaaban, M.I. (2014) Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* **74**, 25-32.

Fisher, K., Rowe, C. and Phillips, C.A. (2007) The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. *Lett Appl Microbiol* **44**, 495–499.

Fisher, K. and Phillips, C. (2008) Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends Food Sci Technol* **19**, 156-164.

Flach, J., Grzybowski, V., Toniazzi, G. and Corção, G. (2014) Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. *Food Sci Technol* **34**(3), 571-576.

Givskov, M., Nys, R.D., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D. and Kjelleberg, S. (1996) Eukaryotic Interference with Homoserine Lactone-Mediated Prokaryotic Signalling. *J Bacteriol* **178**(22), 6618–6622.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. (2009) Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol* **26**, 142–150.

Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* **86**, 985–990.

Harrison, J.J., Ceri, H., Yerly, J., Stremick, C.A., Hu, Y., Martinuzzi, R. and Turner, R.J. (2006) The use of microscopy and three-dimensional visualization to

evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device.

Biol Proced Online **8**(1), 194-215.

Harrison, J.J., Stremick, C.A., Turner, R.J., Allan, N.D., Olson, M.E. and Ceri, H. (2010) Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc* **5**(7), 1236-1254.

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S. and Givskov, M. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol* **148**, 87–102.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P. Kjelleberg, S., Høiby, N. and Givskov, M. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* **22**, 3803-3815.

Hyltdgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R.L. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol* **3**, 1-24.

Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y., Wang, W., Luo, M., Zhao, C., Zu, Y. and Liu, X. (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ Toxicol Pharmacol* **32**, 63–68.

Keller, L. and Surette, M.G. (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**, 249–258.

Kerekes, E.B., Deák, E., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C. and Krisch, J. (2013) Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of

selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *J Appl Microbiol* **115**, 933-942.

Kuehl, R., Al-Bataineh, S., Gordon, O., Luginbuehl, R., Otto, M., Textor, M. and Landmann, R. (2009) Furanone at Subinhibitory concentrations Enhances Staphylococcal Biofilm Formation by *luxS* Repression. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(10), 4159–4166.

Meyer, B. (2003) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeter Biodegrad* **51**, 249-253

Packiavathy, I.A.S.V., Agilandeswari, P., Musthafa, K.S., Pandian, S.K. and Ravi, A.V. (2012) Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Res Int* **45**, 85–92.

Ponnusamy, K., Paul, D., Kim, Y.S. and Kweon, J.H. (2010) 2(5h)-furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. *Braz J Microbiol* **41**, 227-234.

Raut, J.S. and Karuppayil, S.M. (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod* **62**, 250–264.

Shi, X. and Zhu, X. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol* **20**, 407-413.

Shobharani, P. and Agrawal, R. (2010) Interception of quorum sensing signal molecule by furanone to enhance shelf life of fermented Milk. *Food Control* **21**, 61–69.

Simões, M., Simões, L.C. and Vieira, M.J. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci Technol* **43**, 573- 583.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Method* **40**, 175- 179.

Szabó, M.A., Varga, G.Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L. and Molnár, J. (2010) Inhibition of Quorum-sensing Signals by Essential Oils. *Phytotherapy Research* **24**, 782–786.

Szczepanski, S. and Lipski, A. (2014) Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control* **36**, 224-229.

Szumny, A., Figiel, A., Gutierrez-Ortiz, A. and Carbonell-Barrachina, A.A. (2010) Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *J Food Eng* **97**, 253–260.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A. and Nunes, M.L. (2013) Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crops Prod* **43**, 587– 595.

Teles, S., Pereira, J.A., de Oliveira, L.M., Malheiro, R., Machado, S.S., Lucchese, A.M. and Silva, F. (2014) Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. *Ind Crops Prod* **59**, 169–176.

Ugalde, M.L. Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais [Thesis]. Erechim (RS): Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões; 2014.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

A cadeia produtiva do leite tem sua base na propriedade rural e falhas na qualidade da matéria-prima nesse nível apresentam consequências em todas as instâncias subseqüentes. Embora a indústria de laticínios conte com diversos profissionais qualificados e um atuante serviço de inspeção sanitária, na propriedade rural o contexto é completamente diferente: o grau de instrução dos trabalhadores, geralmente baixo, aliado à falta de treinamento e acompanhamento adequados tem reflexos diretos na higienização de equipamentos e utensílios.

A crescente exigência legal da qualidade do leite faz com que a maioria dos produtores invistam na aquisição de equipamentos, como máquinas para ordenha e tanques para resfriamento de leite. No presente estudo, constatou-se a presença de biofilmes microbianos em diversos resfriadores de expansão para leite analisados. Tal resultado pode ser associado à observação de Guerreiro et al. (2005), os quais verificaram que essa mecanização, quando mal utilizada, muitas vezes resulta em níveis de contaminação ainda maiores do que em propriedades com práticas rudimentares.

É importante destacar que a qualidade microbiológica em nível de propriedade rural pode ter grandes avanços com medidas simples, como as

mencionadas na discussão do artigo 1. Guerreiro et al. (2005), ao acompanhar de perto a produção leiteira, corrigiu rotinas anti-higiênicas de forma simplificada. Os autores destacam também que a higienização dos locais de permanência dos animais e do úbere antes e após a ordenha contribuem para a qualidade do leite e, além disso, beneficiam a saúde dos animais, reduzindo a incidência de mastite no rebanho leiteiro. Conseqüentemente, os custos de manutenção do rebanho também são reduzidos.

As elevadas contagens de mesófilos no interior de um equipamento que opera em temperatura de refrigeração, apesar de surpreenderem em um primeiro momento, podem ser relacionadas a diversas falhas relacionadas ao treinamento dos produtores para efetuar a higienização, ou simplesmente às condições de vida de grande parte da população rural. A disponibilidade de água potável e o próprio fornecimento de energia elétrica no meio rural são ainda precários em comparação com o ambiente urbano.

É bastante provável que nenhuma das propriedades analisadas utilizasse água clorada e que a etapa de sanificação sequer fosse rotineiramente efetuada. Interrupções no fornecimento de energia são freqüentes e podem favorecer a reprodução e formação de biofilmes por mesófilos no interior dos tanques de resfriamento, também justificando sua proporção nas amostras coletadas.

Entretanto, é importante mencionar que a presença de biofilmes nos resfriadores de leite está relacionada a uma ou mais falhas no procedimento de higienização. Assim, independentemente do contexto das propriedades rurais, este é mais um trabalho que vem reforçar a importância da qualificação do

produtor rural para o fortalecimento do setor leiteiro. O acompanhamento da produção por extensionistas rurais e outros profissionais é fundamental para que o produtor de leite compreenda a importância da higienização, de como realizá-la e de como investir e dosar os produtos químicos adequados para tal. Dessa forma, certamente o leite produzido terá melhor qualidade, a qual deve ser cada vez mais reconhecida e valorizada financeiramente pela indústria, motivando outros produtores e favorecendo sua permanência na atividade.

A presença frequente e abundante de *Pseudomonas* sp. nas amostragens realizadas corrobora a posição de destaque do gênero na contaminação do leite cru refrigerado (MARCHAND et al., 2009). Já *B. cereus*, mostrou-se uma espécie pouco frequente nos tanques para resfriamento de leite, tendo-se obtido apenas cinco isolados. Amostragens feitas no ambiente da indústria de alimentos revelam que essa espécie é bastante frequente, divergindo do presente trabalho (SHARMA & ANAND, 2002).

Certamente, a higienização e determinados processos da indústria de alimentos exercem uma pressão seletiva muito maior sobre os microrganismos do que a higienização mal conduzida da propriedade rural. Nesse contexto, a seleção de microrganismos produtores de endosporos poderia justificar sua predominância nos biofilmes formados em locais como linhas de produção pós-pasteurização e, inclusive, nos próprios trocadores de calor (BURGESS et al., 2010).

Em relação à caracterização dos microrganismos, os altos percentuais de isolados produtores de proteases e lipases (62,9% e 55,8%, respectivamente) revela o potencial de deterioração do leite por

microrganismos presentes no tanque de resfriamento, independentemente de sua origem (água, ar, manipulador, animal, dentre outras). Destes, salienta-se novamente os isolados de *Pseudomonas* sp., com respectivamente, 90,9% e 75,6%, de produção de protease e lipase, sustentando a posição do gênero como destaque na deterioração de produtos lácteos (MARCHAND et al., 2009).

Já a formação de biofilmes *in vitro* (50,1% dos isolados) evidencia seu potencial para a colonização da superfície do equipamento. Apesar de ser um percentual relativamente baixo, é importante destacar que esse teste reflete somente a habilidade do microrganismo em colonizar superfícies. Microrganismos inábeis na colonização relativamente rápida (como avaliado no teste de formação de biofilmes efetuado) são também isolados de biofilmes multi-espécie, nos quais a colonização da superfície é realizada por outras espécies, mais habilidosas (IBUSQUIZA et al., 2012).

Quanto à cepa de *Pseudomonas* sp. isolada de tanque para resfriamento de leite utilizada nos experimentos dos artigos 2 e 3, a Figura 1 evidencia sua capacidade de formação de biofilme ao longo do tempo. O inóculo inicial, meio de cultura e condições de incubação foram iguais aos utilizados nos desafios com sanificantes, óleos essenciais e furanona. Verifica-se que, após 24h (Figura 1-D), o biofilme apresenta seu estágio final de maturação. Este é caracterizado pela arquitetura tridimensional, com microcanais e expressiva quantidade de matriz extracelular (HALL-STOODLEY et al., 2004).

É importante destacar também a velocidade com que a cepa foi capaz de aderir à superfície: após somente duas horas de contato, resistiu à

aspiração do líquido das cavidades e a duas lavagens com solução salina. Após 8h, já colonizava toda a extensão da superfície. Tais resultados reforçam o consenso de que a formação de biofilmes em ambientes ricos em nutrientes ocorre rapidamente, justificando também a necessidade de higienização frequente de equipamentos e utensílios (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000).

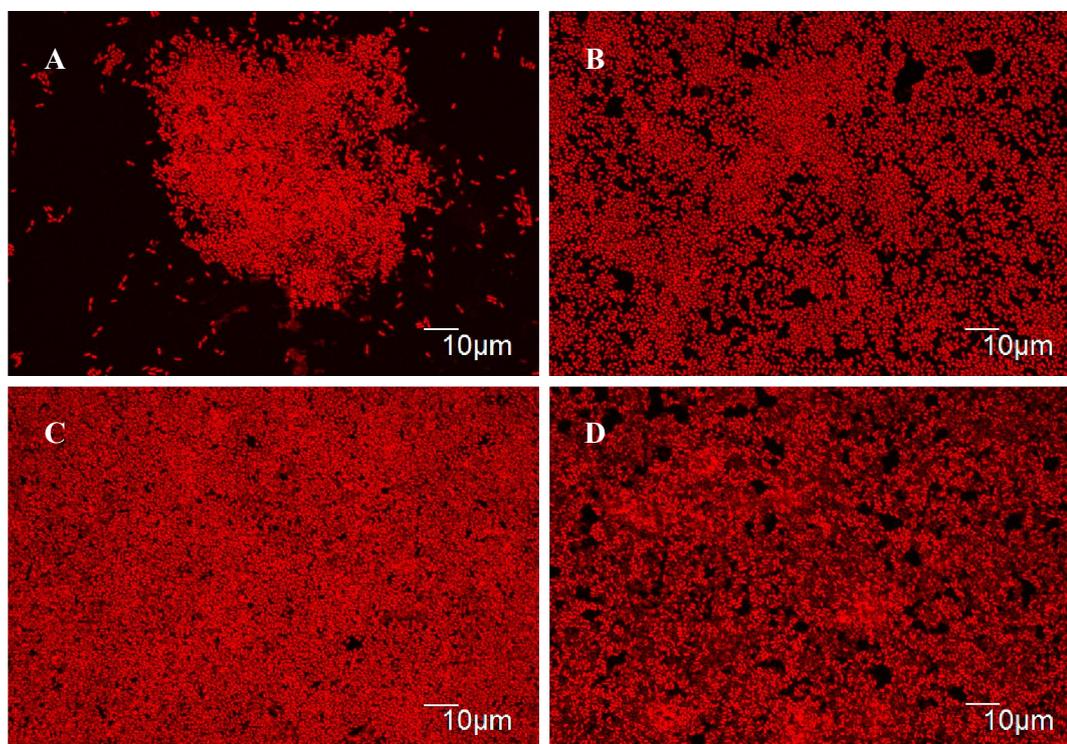


FIGURA 1: Microscopia confocal da formação do biofilme de *Pseudomonas* sp. em placas de poliestireno, após 2h (A), 8h (B), 18h (C) e 24h (D) de incubação estática em caldo LB. Coloração: laranja de acridina (0,1%) (Porto Alegre, 2014).

Além da microscopia confocal, foram realizadas também análises de microscopia de contraste de fase (OLYMPUS BX51) para os testes de controle do biofilme com sanificantes e óleos essenciais. Foram obtidas

imagens correspondentes aos tratamentos efetuados após o primeiro e o terceiro dias consecutivos (Figura 2).

Verifica-se que o ácido peracético, independentemente do óleo essencial combinado, promoveu uma remoção do biofilme representativamente maior do que os óleos isoladamente (testados em concentrações sub-inibitórias). Entretanto, observa-se que o ácido peracético ainda permitiu a manutenção de grande parcela do biofilme inicial, corroborando o resultado da microscopia confocal e respectiva discussão no artigo 2.

As imagens da Figura 2 mostram também que houve aumento na remoção do biofilme comparando-se os dias um e três. Porém, o percentual de remoção do biofilme praticamente não mudou ao longo do tempo (na Figura 1 do artigo 2, página 54). Esta observação foi baseada na DO de cavidades não coradas com cristal violeta. Logo, tais valores refletem a esperada ausência de turbidez nos dias subseqüentes ao tratamento das cavidades com ácido peracético em concentrações superiores à MBC_b , acarretando em valores de remoção do biofilme similares para cada um dos três dias. Se as cavidades tivessem sido coradas com cristal violeta após cada um dos dias, certamente o percentual de remoção do biofilme ao longo do tempo apresentaria variação, pois a DO variaria significativamente em função da retenção do corante.

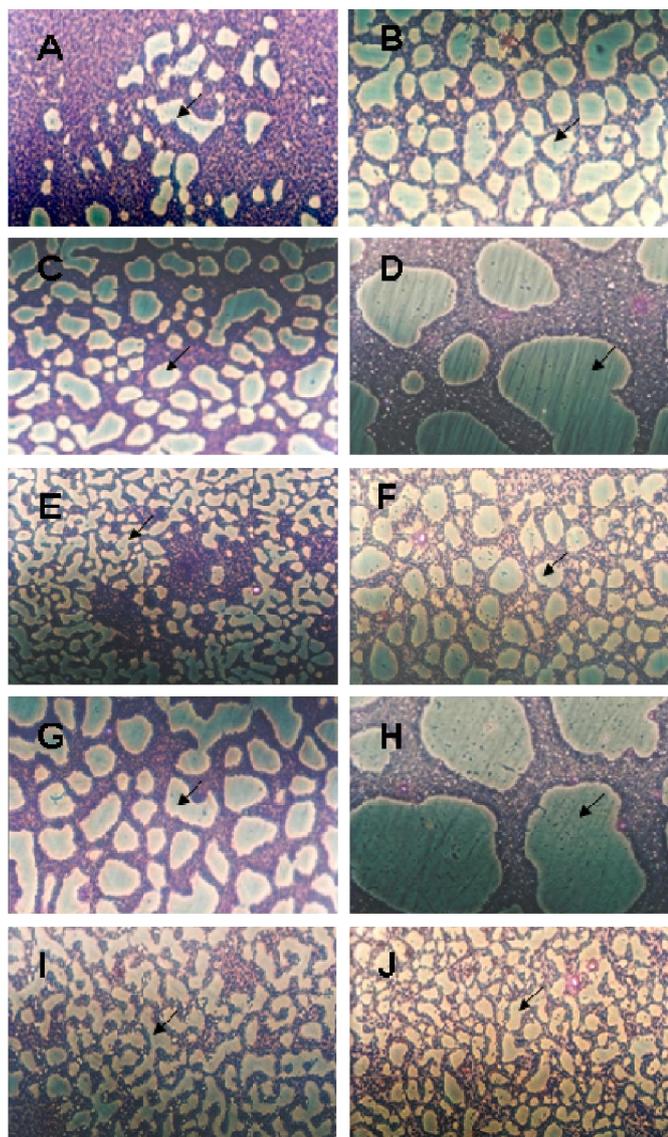


FIGURA 2: Imagens em microscopia de contraste de fase de biofilmes formados por *Pseudomonas* sp. após um dia (primeira coluna) e após três dias (segunda coluna) de tratamento consecutivo com: caldo LB suplementado com tween 20 - controle (A, B); óleo de orégano combinado com ácido peracético (C, D); óleo de orégano isoladamente (E, F); óleo de alecrim combinado com ácido peracético (G, H); óleo de alecrim isoladamente (I, J). As setas indicam locais em que é possível visualizar o fundo da microplaca. O ácido peracético foi diluído a 4% em caldo LB suplementado com tween 20. Os óleos essenciais de orégano e alecrim foram testados nas concentrações sub-inibitórias de 0,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Coloração: violeta genciana (2%), visualizações (OLYMPUS BX51) em aumento de 400x (Porto Alegre, 2014).

Outro ponto a ser destacado na Figura 2 é o de que os óleos essenciais de orégano e alecrim não removeram significativamente o biofilme quando testados em concentrações sub-inibitórias. Jadhav et al. (2013) aplicando óleo essencial de mil folhas (*Achillea Millefolium*), verificaram que a remoção do biofilme aumentava com a concentração do óleo. Porém, quanto maior o tempo de formação do biofilme, mais difícil foi sua remoção: em biofilmes de 20h, a concentração de óleo de 2 x CIM removeu apenas em torno de 40% do biofilme. No presente trabalho, optou-se por testar concentrações sub-inibitórias dos óleos, tanto para reduzir a alteração sensorial (numa possível aplicação comercial), quanto para detectar uma eventual interferência no *quorum sensing* após os tratamentos consecutivos.

Outra possibilidade de avaliar o efeito dos óleos sobre biofilmes seria através de sua combinação. Azeredo et al. (2011) verificaram ação sinérgica entre os óleos de orégano e alecrim. Quando combinados, concentrações inferiores à CIM reduziram as contagens bacterianas de vegetais contaminados artificialmente.

No presente estudo, a ação combinada dos óleos de alecrim e orégano (nas concentrações sub-inibitórias testadas no artigo 2) foi avaliada sobre células em biofilme durante três dias consecutivos e através de microscopia de contraste de fase. Entretanto, não houve inibição do crescimento da cepa, nem tampouco a remoção do biofilme em nenhum dos dias (dados não mostrados). No trabalho de Azeredo et al. (2011), a ação dos óleos não foi avaliada sobre biofilmes e isso talvez justifique seu sucesso nos resultados. Porém, a promissora aplicação da combinação dos óleos para

diversas atividades industriais destacada em seu trabalho justifica a continuidade das pesquisas e abre uma série de novas possibilidades.

5. CONCLUSÕES

1. Os resultados das contagens de mesófilos e psicotróficos indicam a presença de biofilmes microbianos em diversos resfriadores de expansão para leite cru analisados. Consequentemente, os procedimentos de higienização desses equipamentos necessitam ser revistos.

2. Mais da metade dos 297 isolados obtidos foi capaz de produzir enzimas de degradação, bem como de formar biofilmes *in vitro*, com destaque para os isolados do gênero *Pseudomonas* sp. Os resultados indicam o potencial deste gênero e dos biofilmes em si, tanto para a contaminação microbiana, quanto enzimática do leite cru. A cepa com destacada produção de enzimas/biofilme escolhida para a continuidade dos experimentos pertence ao gênero *Pseudomonas* sp.

3. A combinação de ácido peracético com os óleos essenciais de alecrim e orégano não resultou na redução da MBEC/MBC_b, nas condições testadas, em nenhum dos três dias consecutivos de tratamento. Entretanto, apresenta-se como uma ampla e promissora alternativa para pesquisas futuras, tanto para retardar a formação dos biofilmes, quanto para erradicar os já estabelecidos.

4. Os óleos de *Citrus* sp. testados (laranja, mandarina verde, mandarina vermelha e tangerina), com exceção da mandarina verde, não apresentaram ação antimicrobiana ou inibição da formação de biofilme frente à cepa de *Pseudomonas* sp. nas concentrações testadas.

5. Apesar de o óleo de orégano (*Origanum vulgare*) ter apresentado a melhor ação antimicrobiana, o óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), em diversas concentrações sub-inibitórias, foi quem mais interferiu na formação de biofilmes pela cepa, talvez através da interferência no sistema de *quorum-sensing*. Assim, o óleo de alecrim revela-se um promissor candidato à impregnação de superfícies que entram em contato com alimentos, podendo retardar a colonização microbiana em baixas concentrações ($\geq 0,25 \mu\text{L/mL}$).

6. A 2(5H)-furanona favoreceu a formação de biofilmes pela cepa, em concentrações sub-inibitórias. A possibilidade de a espécie estudada não ser *P. aeruginosa* - para a qual a furanona tem comprovada ação inibitória na formação de biofilmes - talvez implique na presença de circuitos de comunicação/receptores diversos, capazes de justificar a má atuação da molécula nesse processo celular.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N.J. **Higiene na Indústria de alimentos**: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008.
- AZEREDO, G.A.; STAMFORD, T.L.M.; NUNES, P.C. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BEJERANO-SAGIE, M.; XAVIER, K.B. The role of small RNAs in quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 189–198, 2007.
- BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M. et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, p. 167–178, 2015.
- BROOKS, J.D.; FLINT, S.H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 2163–2176, 2008.
- BURGESS, S.A.; LINDSAY, D.; FLINT, S.H. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p. 215–225, 2010.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223– 253, 2004.
- COSTERTON J.W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, p. 217–221, 1999.
- DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p.261–289, 2004.

DAVIDSON, P.M.; CRITZER, F.J.; TAYLOR, T.M. Naturally Occurring Antimicrobials for Minimally Processed Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p.163–90, 2013.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K. et al. Influence of Storage Conditions on the Growth of *Pseudomonas* Species in Refrigerated Raw Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 460–470, 2011.

DUBEY, G.P.; BEN-YEHUDA, S. Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication. **Cell**, v. 144, p. 590–600, 2011.

ENDERSEN, L.; O'MAHONY, J.; HILL, C. et al. Phage Therapy in the Food Industry. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 327–49, 2014.

GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049–1056, 2008.

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

GILBERT, P.; McBAIN, A.J. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 189–208, 2003.

GILBERT, P.; McBAIN, A.J.; RICKARD, A.H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 245–248, 2003.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24, 2012.

HOOSHANGI, S.; BENTLEY, W.E. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 550–555, 2008.

HOURY, A.; GOHAR, M.; DESCHAMPS, J. et al. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 32, p. 13088–13093, 2012.

IBUSQUIZA, P.S.; HERRERA, J.J.R.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. **Food Control**, v. 25, p. 202-210, 2012.

JADHAV, S.; SHAH, R.; BHAVE, M.; et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, p. 125-130, 2013.

JOHANSEN, C.; FALHOLT, P.; GRAM, L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3724–3728, 1997.

KELLER, L.; SURETTE, M.G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 249–258, 2006.

MAILLARD, J.Y. Bacterial target sites for biocide action. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 16–27, 2002.

MANN, E.E.; WOZNIAK, D.J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 893–916, 2012.

MARCHAND, S.; HEYLEN, K.; MESSENS, W. et al. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *P. lundensis* and *P. fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk Samples. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 467–482, 2009.

MARCHAND, S.; DE BLOCK, J.; DE JONGHE, V. et al. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 133-147, 2012.

MARTINELLI, D.; GROSSMANN, G.; SÉQUIN, U. et al. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. **BMC Microbiology**, v. 4, n. 25, p. 1-10, 2004.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 249–253, 2003.

MITTELMAN, M.C. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2760–2764, 1998.

OH, Y.J.; LEE, N.R.; JO, W. et al. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**, v. 109, p. 874–880, 2009.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 27-33, 2005.

PENG, J.S.; TSAI, W.C.; CHOU, C.C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 105-111, 2001.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, p. 361-365, 2000.

RAATS, D.; OFFEK, M.; MINZ, D. et al. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology**, v. 28, p. 465-471, 2011.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RYAN, R.P.; DOW, J.M. Diffusive signals and interspecies communication in bacteria. **Microbiology**, v. 154, p. 1845–1858, 2008.

SAUER, K.; RICKARD, A.H.; DAVIES, D.G. Biofilms and biocomplexity. **American Society for Microbiology**, v. 2, p. 347-353, 2007.

SCHAUDER, S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M.G. et al. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 463–476, 2001.

SCHUSTER, M.; SEXTON, D.J.; DIGGLE, S.P. et al. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 67, p. 43–63, 2013.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, v. 13, p. 469–477, 2002.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; MACHADO, I. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, p. 338–345, 2006.

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

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SPOERING, A.L.; GILMORE, M.S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 133–137, 2006.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v. 36, p. 224-229, 2014.

WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 182-191, 2009.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.

7. APÊNDICES

7.1. Resumo de artigo elaborado em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI Campus Erechim, a ser submetido para o periódico *Enzyme and Microbial Technology*.

Remoção de biofilme de *Pseudomonas* sp. por enzimas comerciais e extrato enzimático produzido a partir de resíduos agroindustriais

Valeria Borszcz¹, Juliana Flach², Viviane Astolfi¹, Taísa Renata Piotroski Boscato³, Raíza de Almeida Mesquita³, Gertrudes Corção², Rogério Luis Cansian¹, Geciane Toniazzo¹

1 - Departamento de Ciências Agrárias – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - URI – Campus Erechim - Erechim, RS, Brasil.

2 – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente PPGMAA - UFRGS - Porto Alegre, RS, Brasil.

3 - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Campus Erechim - Erechim, RS, Brasil.

RESUMO

A remoção enzimática de biofilmes formados por *Pseudomonas* sp. isolada de resfriador de expansão para leite cru foi determinada através de coloração com cristal violeta e microscopia de escaneamento confocal a *laser*. Foram testados dois extratos enzimáticos e quatro enzimas comerciais. O extrato enzimático produzido por uma cepa de *Aspergillus niger* cultivada em água de maceração de milho, casca de laranja e farelo de trigo removeu satisfatoriamente o biofilme após 10 min de contato, de maneira similar à protease e celulase comerciais. A amilase e a pectinase comerciais testadas tiveram atividade insignificante de remoção do biofilme, assim como o extrato enzimático de *Trichoderma reesei* produzido a partir do crescimento fúngico em casca de soja. Os resultados indicam uma promissora e economicamente viável alternativa para a remoção enzimática de biofilmes, cujas aplicações extrapolam a área de alimentos.