

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Agronomia  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**Formação de Biofilmes em Diferentes Materiais  
Utilizados na Indústria de Processamento de Leite**

Juliana Flach  
(Bióloga – UFRGS)

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Área de concentração: Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil  
Março de 2006

Dedico a meus pais Imelda e José Inácio,  
pelo incentivo à educação de seus filhos.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Gertrudes Corção, pela orientação, confiança e apoio.

Aos funcionários e professores do Departamento de Microbiologia e do PPG pelo conhecimento transmitido e auxílio na execução do projeto.

Às amigas e colegas de laboratório, pela amizade, estímulo, sugestões e convívio agradável.

À Carolina Karnopp, pelo valioso auxílio na execução do projeto, pela amizade e disponibilidade.

À minha querida família, pelo envolvimento, compreensão e impagável auxílio no desenvolvimento do projeto.

Às irmãs Janete Flach e Ângela Flach pela convivência, incentivo, paciência, ajuda e carinho.

Ao Marcos André Vrielink, pelo amor, compreensão, paciência e apoio incondicional.

Ao núcleo de Assessoria em Estatística (NAE-UFRGS) pelo auxílio na execução da análise estatística.

À Claudete Inês Locatelli e Clóvis Prates pelo auxílio na execução do projeto.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para minha formação.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

## Formação de Biofilmes em Diferentes Materiais Utilizados na Indústria de Processamento de Leite.<sup>1</sup>

Autora: Juliana Flach

Orientadora: Gertrudes Corção

### RESUMO

Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos frequentemente são prejudiciais, uma vez que podem abrigar patógenos e deteriorantes que contaminam os produtos. Este trabalho se propôs a avaliar e correlacionar o papel dos fatores de adesão e da hidrofobicidade na formação de biofilmes em diversos materiais. Leite *in natura* foi aliquoteado em tubos contendo corpos de prova constituídos de vidro, polipropileno, aço inoxidável e pano de algodão e incubados em 10 °C e 25 °C. Após 2 h, 5 h e 8 h de contato, as células não aderidas foram removidas da superfície dos materiais, e as aderidas contadas em PCA. Foram isolados e identificados microrganismos dos biofilmes, sendo verificada a produção de cápsula (coloração com vermelho congo), fímbria (hemaglutinação em placa), hemolisinas (ágar sangue) e proteases (ágar leite). As hidrofobicidades celular e dos materiais foram determinadas pelos testes de agregação com sulfato de amônio e do ângulo do raio da gota séssil, respectivamente. Verificou-se a adesão de consórcios formados por *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*. Os 103 isolados obtidos pertencem, principalmente, a espécies da família *Enterobacteriaceae* (46) e do gênero *Staphylococcus* (45). Na produção de fatores de virulência, 50,4% dos isolados produziram cápsula, 48,5% produziram fímbria, 55,3% hemolisina e 20,3% proteases. Dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, 86,6% e 84,4% foram positivos para o teste de hidrofobicidade, respectivamente. O aço inoxidável foi o material mais hidrofóbico testado, seguido por polipropileno e vidro. A temperatura de 25 °C e o polipropileno foram os maiores favorecedores de adesão dos consórcios bacterianos.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114 p.) Março, 2006.

## **Biofilm Formation on Different Materials in the Dairy Industry.<sup>1</sup>**

Author: Juliana Flach

Adviser: Gertrudes Corção

### **ABSTRACT**

Bacterial biofilm represents a concern to food industry, once they can harbour pathogenic microorganisms which cause food contamination. The present study evaluated and correlated the role of adhesion factors and hydrophobicity in biofilm formation in different materials. Raw milk samples were aliquoted into test tubes with pieces of glass, polypropylene, stainless steel and cotton cloth, and they were incubated at 10 °C and 25 °C. After 2, 5 and 8 hours, the non attached cells were removed from the pieces and the attached cells were enumerated in PCA agar. The microorganisms from the biofilms were isolated and identified and the production of capsule (Congo red staining), fimbriae (hemagglutination), hemolysins (Blood Agar) and proteases (milk agar) were verified. The cellular and material hydrophobicity were determined by Ammonium Sulphate agglutination and contact angle measurement, respectively. The adhesion of *E. coli*, *S. aureus* and *B. cereus* consortium cells were also analysed. The 103 identified isolates from the raw milk belonged mainly to Enterobacteriaceae species (46) and to *Staphylococcus* genus (45). As regards the virulence factor production, 50.4% were capsule producers, 48.5% were fimbriae producers, 55.3% produced hemolysin and 20.3% produced protease. Among Gram positive and Gram negative microorganisms, 86.6% and 84.4% respectively, were positive for the hydrophobicity test. Among the analysed materials, the most hydrophobic one was the stainless steel, followed by the polypropylene and the glass. The adhesion of the consortium cells were favored mainly by the 25 °C temperature and the polypropylene conditions.

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Environmental and Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (114 p.) March, 2006.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	i
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biofilmes e a indústria de alimentos .....	4
2.2 Etapas da formação de biofilmes .....	9
2.3 Fatores que podem influenciar na formação de biofilmes .....	11
2.3.1 Hidrofobicidade celular.....	13
2.4 Adesão de microrganismos aos materiais .....	14
2.5 Fatores de virulência bacteriana e formação de biofilmes.....	16
2.5.1 Fímbria.....	16
2.5.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	18
2.6 Microrganismos patogênicos envolvidos na formação de biofilmes e analisados no presente estudo.....	20
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2.6.2 <i>Bacillus cereus</i> .....	21
2.6.3 <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.7 Controle da formação de biofilmes .....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Coleta das amostras de leite <i>in natura</i> .....	26
3.2 Análise da aderência bacteriana aos materiais .....	26
3.2.1 Análise da formação de biofilmes e obtenção dos microrganismos de interesse .....	27
3.2.2 Leitura dos tubos controle.....	28
3.2.3 Isolamento de microrganismos presentes nos biofilmes.....	28
3.3 Teste dos fatores de virulência.....	29
3.3.1 Produção de cápsula .....	29
3.3.2 Produção de hemolisina.....	29
3.3.3 Produção de protease.....	30
3.3.4 Produção de fímbrias .....	30
3.4 Avaliação da hidrofobicidade bacteriana e dos materiais .....	32
3.4.1 Teste do sulfato de amônio.....	32
3.4.2 Mensuração do ângulo do raio da gota séssil.....	32
3.5 Teste de aderência <i>in vitro</i> de espécies bacterianas isoladas.....	33
3.5.1 Curva de crescimento .....	33
3.5.2 Teste de aderência dos consórcios bacterianos .....	35
3.5.2.1 Padronização do inóculo .....	35
3.5.2.2 Teste de aderência <i>in vitro</i> .....	36
3.6 Visualização dos microrganismos aderidos.....	37
3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
3.6.2 Microscopia de epifluorescência .....	39
3.6.3 Análise estatística .....	39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1 Isolamento e caracterização dos microrganismos aderidos aos materiais de estudo.....	40
4.2 Produção de fatores de virulência .....	43
4.3 Avaliação da hidrofobicidade bacteriana (Teste do sulfato de amônio).....	44
4.4 Caracterização dos materiais quanto à aderência de microrganismos .....	46
4.4.1 Análise da formação de biofilmes nos diferentes materiais .....	46
4.4.2 Hidrofobicidade dos materiais .....	50
4.4.2.1 Mensuração do ângulo do raio da gota séssil .....	50
4.5 Associação entre as características da célula bacteriana e sua adesão aos materiais estudados .....	53
4.6 Teste de aderência <i>in vitro</i> de espécies bacterianas isoladas.....	58
4.6.1 Curvas de crescimento .....	58
4.6.2 Teste de aderência dos consórcios bacterianos .....	61
4.7 Visualização dos microrganismos aderidos.....	71
4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	71
4.7.2 Microscopia de epifluorescência .....	78
5. CONCLUSÕES .....	81
6. REFERÊNCIAS.....	82
7. APÊNDICES .....	90
8. VITA.....	114

## RELAÇÃO DE TABELAS

1. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de biofilmes formados em corpos de prova compostos de vidro, polipropileno, aço inoxidável e pano de algodão em contato com leite *in natura*. ..... 41
2. Distribuição dos 103 isolados de biofilmes formados em leite *in natura*, com relação ao tempo de contato do leite com os materiais e à temperatura de incubação..... 42
3. Proporção de aumento das contagens de células bacterianas aderidas entre os tempos de contato em relação ao número de células bacterianas do leite (controle) nas temperaturas de 10 °C e 25 °C. Poliprop = Polipropileno..... 50
4. Ângulos do raio da gota séssil medidos para cada material em relação ao líquido gotejado (leite e água). Os valores representam a média de 5 repetições.52
5. Distribuição dos fatores de virulência produzidos pelos isolados bacterianos de cada material, excetuando-se os isolados não enquadrados nos grupos. MATER.= material; CÁP = cápsula; FÍM/ADES = fimbria/adesinas; HIDRO. = hidrofobicidade; Poliprop.= polipropileno..... 55

## RELAÇÃO DE FIGURAS

1. Modelo de estrutura do biofilme (adaptado do Center for Biofilm Engineering, Montana State University, USA)..... 6
2. Etapas envolvidas na formação de biofilmes (Bento, 2001). ..... 10
3. Contagem de bactérias presentes no leite *in natura* e aderidas aos diferentes materiais após 2 h, 5 h e 8 h de contato, na temperatura de 10 °C. \* O controle representa o número de células bacterianas contidas no leite, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 47
4. Contagem de bactérias presentes no leite *in natura* e aderidas aos diferentes materiais após 2 h, 5 h e 8 h de contato, na temperatura de 25 °C. \* O controle representa o número de células bacterianas contidas no leite, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 48
5. Visualização da gota séssil para os materiais vidro, polipropileno (poliprop.) e aço inoxidável, com variação do líquido gotejado (água e leite). Os ângulos foram medidos a partir das imagens. (Porto Alegre, 2005). ..... 52
6. Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em TSB a 35 °C com agitação de 100 rpm e acompanhamento de 12h. (Porto Alegre, 2005). ..... 59
7. Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em leite integral UHT a 35 °C com agitação de 100 rpm e acompanhamento de 6h. (Porto Alegre, 2005). ..... 59
8. Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em leite integral UHT a 10 °C, sem agitação e acompanhamento de 8h. (Porto Alegre, 2005). ..... 60
9. Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em leite integral UHT a 25 °C, sem agitação, e acompanhamento de 8h. (Porto Alegre, 2005). ..... 60
10. Adesão de *E. coli* (EC) ao vidro, em cultura pura ou em combinação com *B. cereus* (BC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *E. coli* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 61

- 11.** Adesão de *E. coli* (EC) ao aço inoxidável, em cultura pura ou em combinação com *B. cereus* (BC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *E. coli* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 62
- 12.** Adesão de *E. coli* (EC) ao polipropileno, em cultura pura ou em combinação com *B. cereus* (BC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *E. coli* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 62
- 13.** Adesão de *S. aureus* (SA) ao vidro, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *B. cereus* (BC), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *S. aureus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 63
- 14.** Adesão de *S. aureus* (SA) ao aço inoxidável, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *B. cereus* (BC), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *S. aureus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 64
- 15.** Adesão de *S. aureus* (SA) ao polipropileno, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *B. cereus* (BC), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *S. aureus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 64
- 16.** Adesão de *B. cereus* (BC) ao vidro, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *B. cereus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 65
- 17.** Adesão de *B. cereus* (BC) ao aço inoxidável, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *B. cereus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005)..... 66

- 18.** Adesão de *B. cereus* (BC) ao polipropileno, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *B. cereus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005). ..... 66
- 19.** Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) dos materiais não submetidos ao ensaio de adesão. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 1000x; B = 1000x; C = 2000x; D = 1100x. (Porto Alegre, 2005). ..... 72
- 20.** Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) do aço inoxidável, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 9500x; B = 2000x; C = 2000x; D = 2000x; E = 850x; F = 2200x. (Porto Alegre, 2005). ..... 73
- 21.** Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) do pano de algodão, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 2000x; B = 1800x; C = 2000x; D = 2000x; E = 4300x; F = 2000x. (Porto Alegre, 2005). ..... 74
- 22.** Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) do polipropileno, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 3000x; B = 2300x; C = 2000x; D = 8500x; E = 8500x; F = 3700x. (Porto Alegre, 2005). ..... 75
- 23.** Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) do vidro, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 2000x; B = 1000x; C = 3700x; D = 3000x; E = 2000x; F = 3700x. (Porto Alegre, 2005). ..... 76
- 24.** Imagens em microscopia de epifluorescência dos corpos de prova não submetidos ao ensaio de adesão (controle). As imagens foram obtidas em aumento de 1000x utilizando laranja de acridina como corante. (Porto Alegre, 2005). ..... 79
- 25.** Imagens em microscopia de epifluorescência dos microrganismos aderidos em consórcios com 2 espécies bacterianas, após 8h de contato na temperatura de 25 °C, em diferentes materiais. As imagens foram obtidas em aumento de 1000x utilizando laranja de acridina como corante. EC = *E. coli*; SA = *S. aureus*; BC = *B. cereus*. (Porto Alegre, 2005). ..... 79

**26.** Imagens em microscopia de epifluorescência dos microrganismos aderidos em cultura pura e em consórcios com as 3 espécies bacterianas, após 8h de contato na temperatura de 25 °C. As imagens foram obtidas em aumento de 1000x utilizando laranja de acridina como corante. EC = *E. coli*; SA = *S. aureus*; BC = *B. cereus*. (Porto Alegre, 2005). ..... 80

**RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

%= percentual  
 $\mu$ = velocidade específica de crescimento  
 $\alpha$ = alfa; nível de significância estatística  
® = marca registrada  
 $\pm$  = mais ou menos  
(-) = negativo  
(+) = positivo  
 $\mu$ L = microlitro  
ANOVA = Análise de Variância  
ATCC = American Type Culture Collection  
cm = centímetro  
 $\text{cm}^2$  = centímetro quadrado  
D. O. = densidade óptica  
D. O. <sub>f</sub> = densidade óptica final  
D. O. <sub>i</sub> = densidade óptica inicial  
DNA = ácido desoxirribonucléico  
DNAse = enzima que digere o ácido desoxirribonucléico  
G = Tempo de geração  
g/L = grama por litro  
g/mL = grama por mililitro  
kHz = quilohertz  
M = molar  
MEV = microscopia eletrônica de varredura  
MFA = microscopia de força atômica  
MHz = Megahertz  
mL = mililitro  
mm = milímetro  
N<sub>f</sub> = número final de células  
N<sub>i</sub> = número inicial de células  
nm = nanômetro  
n° = número  
°C = graus Celsius  
PBS = Salina Fosfatada Tamponada  
r.p.m. = rotações por minuto  
sp. = espécie  
spp. = espécies  
t = tempo  
TSA = ágar triptona de soja  
TSB = caldo triptona de soja  
PCA = Ágar para contagem em placa  
UFC = unidades formadoras de colônia  
UFC/mL = unidades formadoras de colônia por mililitro

$V_f$  = volume final  
 $V_i$  = volume inicial  
W = Watts

## 1. INTRODUÇÃO

Na sociedade atual, a procura por produtos alimentícios industrializados aumenta a cada dia. Concomitantemente, há um aumento crescente na preocupação com a segurança do alimento da população, e que tem sido compartilhada por profissionais de diversas áreas. Essa preocupação manifesta-se tanto no sentido de fiscalizar o processo de produção dos alimentos, quanto no desenvolvimento de pesquisas científicas que busquem trazer subsídios com o intuito de direcionar e aperfeiçoar as técnicas e processos que compreendem aquilo que chamamos de Tecnologia de Alimentos.

Entretanto, apesar de terem sido objeto de diversas pesquisas, indústrias como as de processamento de leite ainda enfrentam vários problemas, como os que se referem aos processos de limpeza e sanificação dos equipamentos. Isso, principalmente devido à formação de biofilmes microbianos nos equipamentos da linha de produção, aumentando a resistência dos microrganismos aderidos aos tratamentos antimicrobianos aplicados, permitindo que estes se multipliquem e, eventualmente, contaminem os alimentos com os quais entram em contato.

Uma vez que boa parte dos microrganismos patogênicos presentes no leite é capaz de organizar-se em biofilmes, as conseqüências da formação destes, são alimentos com uma carga microbiana acima do permitido pela legislação, muitas vezes composta de grande número de patógenos e cuja presença acaba colocando em risco a saúde do consumidor. Considerando o fato de que o leite é consumido por uma parcela significativa da população que apresenta alguma deficiência imunológica (crianças, idosos e adultos imunocomprometidos), alterações de ordem microbiológica nesse alimento representam sério problema de saúde pública. Além disso, o aumento da carga microbiana do produto reduz significativamente sua vida de prateleira, resultando em prejuízos financeiros também para a indústria de alimentos.

Devido a isso, a formação de biofilmes nas indústrias de alimentos deve ser evitada, utilizando-se para tal, higienizações freqüentes o suficiente para prevenir sua formação ou evitar o aumento de seus níveis de adesão e espessura, que dificultam a limpeza. Como a formação dos biofilmes no ambiente industrial pode ocorrer em questão de poucas horas, seria necessária a interrupção da linha de fabricação dos produtos lácteos diversas vezes ao dia, algo que também não é viável, sob o ponto de vista econômico. Aliás, o alto risco microbiológico de alguns produtos colocados à venda é devido justamente à supervalorização da produção em detrimento da qualidade alimentar.

Vidro, aço inoxidável, polipropileno e pano de algodão são materiais freqüentemente encontrados nas indústrias de laticínios, sendo empregados na confecção de tanques de armazenamento, superfícies de manipulação (aço

inoxidável), fôrmas, superfícies de corte (polipropileno), acessórios (pano de algodão), constituintes de tubulações e revestimento de recipientes (vidro), entre outras finalidades.

Entre os fatores relacionados com a formação dos biofilmes nos equipamentos da indústria, podemos citar características físicas e químicas do tipo de material com o qual estes são confeccionados. Nesse sentido, a escolha de materiais que dificultem a adsorção de matéria orgânica e microrganismos é fundamental.

Este trabalho se propôs a avaliar a aderência de microrganismos contidos no leite sobre materiais utilizados na indústria de processamento de leite: vidro, polipropileno, aço inoxidável e pano de algodão, buscando determinar a influência que têm os fatores tempo, temperatura e produção de fatores de virulência sobre a adesão. Além disso, pretendeu-se estudar a aderência de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* a esses materiais, isoladamente ou em consórcio. A contribuição deste trabalho se deu no sentido de fornecer informações à indústria de alimentos e a pesquisas que busquem alternativas em relação ao controle microbiológico nesse nível.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Biofilmes e a indústria de alimentos**

Atualmente, o hábito de processar alimentos em larga escala através de linhas de produção tem se tornado cada vez mais corriqueiro. A pressão exercida por parte dos consumidores vem no sentido de que esses alimentos industrializados tenham sua carga de conservantes reduzida, sem que, entretanto, sejam diminuídas a vida de prateleira do produto e suas propriedades sensoriais. Devido a isso, surgiu a necessidade de desenvolver métodos de controle microbiológico em nível de indústria, que possam garantir a segurança do alimento, mas que não sejam invasivos a ponto de descaracterizá-lo sensorialmente.

Porém, o desenvolvimento de tais métodos de controle não tem sido uma tarefa fácil, principalmente devido à formação dos chamados “biofilmes microbianos” nos equipamentos da indústria. O processo de automatização das indústrias e o desenvolvimento de equipamentos mais complexos, os quais propiciam um grande número de nichos para a adesão e o crescimento de microrganismos, contribuem para o aumento destes biofilmes (Pompermayer & Gaylarde, 2000). Embora superfícies de equipamentos ou utensílios que entram em contato com alimentos durante o processo de industrialização não devam

contaminar ou aumentar a incidência de microrganismos, sejam deteriorantes ou patogênicos, sabe-se que, sob determinadas condições, estes se depositam, aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular. A multiplicação forma microcolônias e, quando a massa celular é suficientemente grande para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, está formado o que se chama de biofilme microbiano (Zottola & Sasahara, 1994).

De maneira mais abrangente, biofilmes podem ser definidos como “populações microbianas envolvidas em uma matriz e aderidas umas às outras e/ou a superfícies ou interfaces” (Costerton et al., 1995). O biofilme é uma estrutura porosa e complexa, formada por uma ou mais espécies de microrganismos, onde as bactérias formam microcolônias rodeadas de grandes quantidades de exopolissacarídeos. Entre as microcolônias, existem canais para abastecimento de água, que promovem o influxo de nutrientes e o efluxo de produtos de metabolismo (Figura 1). Análises bioquímicas da estrutura de exopolissacarídeos (EPS) revelam que os biofilmes são hidrogéis. Trata-se de uma forma de organização microbiana que predomina tanto na natureza quanto em sistemas hospitalares e industriais (Izquierdo & Hernández, 2002; Stoodley et al., 2004).



FIGURA 1: Modelo de estrutura do biofilme (adaptado do Center for Biofilm Engineering, Montana State University, USA).

A estrutura de um biofilme maduro é profundamente influenciada pelas condições do ambiente em que ele se formou, como a natureza do material, disponibilidade de nutrientes, hidrodinâmica, espécies de microrganismos presentes, grau de contaminação microbiana, entre outros (Stickler, 1999; Ludensky, 2003). Assim, cada biofilme é diferente em essência, inexistindo um modelo capaz de contemplar todas as variáveis (Meyer, 2003). Sabe-se que a estrutura de um biofilme maduro pode variar de uma fina camada de microcolônias (ambientes oligotróficos), até uma densa concentração de microrganismos organizados em multicamada, como os biofilmes da placa dental e de cateteres urinários (Stickler, 1999; Poulsen, 1999).

No biofilme, por estarem embebidas em uma matriz polimérica, as células microbianas são diferentes de quando em suspensão. Essa diferença manifesta-se principalmente na resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na desinfecção dos equipamentos, a qual aumenta consideravelmente, de 10 a

100 vezes (Forsythe, 2002). Uma vez que diversas condições de estresse - principalmente com relação à disponibilidade de nutrientes - são capazes de induzir a formação de microcolônias, a formação de biofilmes, em alguns casos, pode ser entendida como uma resposta adaptativa às condições do meio, talvez pela maior concentração de nutrientes na superfície do que em suspensão (Hood & Zottola, 1995; Webb et al., 2003, Stoodley et al., 2004).

Cabe ressaltar também que a organização de populações microbianas em biofilmes fornece a elas vários outros benefícios além da resistência a antimicrobianos, como a criação de um micronicho próprio, proteção contra dessecação, aumento da disponibilidade de nutrientes e de sua absorção através dos polissacarídeos extracelulares (Meyer, 2003).

Dessa maneira, a formação de biofilmes microbianos nos equipamentos da linha de produção de uma indústria de alimentos é motivo de preocupação, uma vez que muitos dos microrganismos patogênicos ou esporulados associados aos alimentos são freqüentemente encontrados em biofilmes. Logo, existiria a possibilidade de transferência de microrganismos dos biofilmes para os alimentos que entram em contato com as superfícies onde eles estão formados (Poulsen, 1999), tornando o biofilme um ponto crítico de contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, aumentando a carga microbiana do produto e gerando perdas de caráter econômico e de qualidade alimentar (Meyer, 2003).

Assim, a contaminação cruzada em indústrias de alimentos, causada principalmente pela presença de biofilmes, torna-se um dos principais problemas a

serem enfrentados. Segundo Pompermayer & Gaylarde (2000), microrganismos provenientes da matéria-prima *in natura*, do ambiente, dos manipuladores e de outras fontes ganham entrada na linha de produção, sobrevivendo à limpeza e à desinfecção dos equipamentos. Além disso, esse estudo reforçou o fato de que, mesmo manipulando os alimentos em condições de baixas temperaturas, é fundamental que se disponha de alimentos *in natura* de boa qualidade, funcionários bem treinados e rotinas de limpeza suficientemente freqüentes.

Problemas decorrentes da formação de biofilmes também são comuns em indústrias de processamento de leite. Nesse caso, a composição microbiológica e seu número, já na matéria-prima são de extrema importância para a determinação da qualidade dos produtos finais obtidos após a pasteurização, principalmente porque no leite *in natura* podemos encontrar microrganismos termorresistentes, produtores de endosporos e/ou de toxinas resistentes ao calor, que podem vir a ser produzidas antes do tratamento térmico.

Como exemplo desses microrganismos pode-se citar *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. O primeiro é importante degradador de alimentos processados termicamente, uma vez que é capaz de produzir endosporos, proteases e toxinas resistentes ao calor, estas, responsáveis por surtos de toxinfecções alimentares em humanos. O segundo microrganismo, apesar de não sobreviver aos tratamentos térmicos, é um conhecido produtor de enterotoxinas termoestáveis também causadoras de toxinfecções alimentares. Ambos são capazes de se organizar em biofilmes (Forsythe, 2002).

No entanto, a formação de biofilmes nem sempre é prejudicial: em indústrias que produzem alimentos fermentados, biofilmes formados por bactérias produtoras de ácido acético em biorreatores são os responsáveis pela conversão de diversos substratos em vinagre. Outro exemplo seria a utilização dos biofilmes para o tratamento aeróbio e anaeróbio de águas, na tentativa de remover matérias orgânica e inorgânica (Gilbert et al., 2003).

## **2.2 Etapas da formação de biofilmes**

A formação de biofilmes é um processo que possui várias etapas, cujo número varia conforme o autor. Segundo Stoodley et al. (2004), há cinco etapas, onde as duas primeiras são caracterizadas por uma fraca interação do microrganismo com a superfície, seguida de forte adesão. As etapas três e quatro envolveriam a agregação de células em microcolônias, com crescimento e maturação subsequente. O último estágio seria o retorno à motilidade quando o biofilme tem partes suas desagregadas.

Porém, a maioria dos autores divide o processo de formação de biofilmes em duas fases principais (Figura 2): a fase reversível, caracterizada pela proximidade do microrganismo à superfície, e a fase irreversível caracterizada pela ligação entre microrganismo e superfície (Hood & Zottola, 1995; Kumar & Anand, 1998; Gilbert et al., 2003).

Na etapa reversível de formação dos biofilmes, a interação entre o microrganismo e a superfície ocorre através de forças de longo alcance (atração eletrostática, forças de Van der Waals) e forças de curto alcance (ligações

químicas e interações hidrofóbicas). Essa adesão inicial também está diretamente relacionada à disponibilidade de nutrientes (no meio ambiente e sobre a própria superfície) e à fase de crescimento em que o microrganismo se encontra. Nessa etapa, as bactérias exibem movimento “browniano”, podendo ser facilmente desagregadas da superfície com uma simples lavagem e tornando-se planctônicas novamente (Hood e Zottola, 1995; Kumar & Anand, 1998).

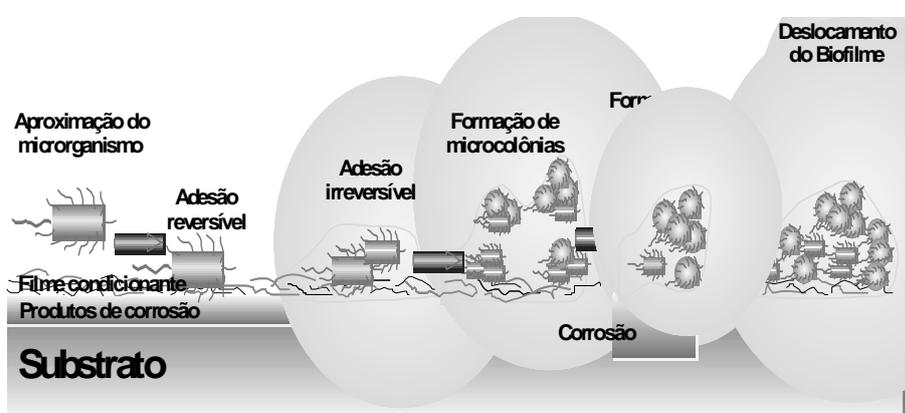


FIGURA 2: Etapas envolvidas na formação de biofilmes (Bento, 2001).

Já a fase irreversível de adesão, ocorre subseqüentemente à fase reversível e caracteriza-se pela produção de apêndices celulares como flagelos, adesinas fímbricas e não fímbricas, pili e uma grande quantidade de exopolissacarídeos (EPS) e fibrilas. Nessa fase, as forças de curto alcance incluem as interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e covalentes, além das interações hidrofóbicas. As fibrilas poliméricas formariam uma ponte entre o microrganismo e o substrato, permitindo uma associação dita irreversível, uma vez que apenas forças de grande intensidade seriam capazes de

remover o biofilme formado. (Kumar & Anand, 1998). Se as forças de interação forem intensas o suficiente, a célula produz EPS que a auxiliam na ancoragem (Hood & Zottola, 1995).

Biofilmes são encontrados quase que exclusivamente em superfícies sólidas de ambientes úmidos ou líquidos. Sua formação muitas vezes é favorecida nesses ambientes, pela difusão ou fluxo de substâncias orgânicas e inorgânicas em direção ao substrato, formando o chamado filme condicionante. O acúmulo desse filme condicionante leva à alta concentração de nutrientes no substrato, em comparação à fase fluida, sendo que o filme também é capaz de reter células bacterianas, as quais passarão pelos eventos de formação de biofilmes anteriormente descritos. Além disso, em certos ambientes como o hospitalar e o da indústria de processamento de alimentos, biofilmes podem ser formados em superfícies que entram em contato com os alimentos ou tecidos, através da adsorção de substâncias e microrganismos a elas (Kumar & Anand, 1998). As características físico-químicas do substrato e do microrganismo são fundamentais no favorecimento ou não da formação dos biofilmes.

### **2.3 Fatores que podem influenciar na formação de biofilmes**

Existem vários fatores que condicionam a formação dos biofilmes. Um dos principais está relacionado com características do próprio material que serve de substrato à sua formação. Segundo Poulsen (1999), parâmetros físicos como carga elétrica, hidrofobicidade e microtopografia do substrato são capazes de influir no grau de adesão das células. Outros fatores que podem influenciar na

adesão de microrganismos seriam a sua fase e taxa de crescimento, presença de matéria orgânica, sua deposição e acúmulo no sistema pH e temperatura ambientais (Meyer, 2003). Entretanto, existem poucas informações a respeito do efeito da temperatura na adesão de microrganismos patogênicos a superfícies utilizadas na indústria de alimentos.

Conforme Izquierdo & Hernández (2002), a capacidade de *Escherichia coli* formar biofilmes é fortemente influenciada pelo ambiente nutricional disponível, proporcionado, nesse caso, por meios de cultura com diferentes composições.

Os flagelos são apêndices bacterianos relacionados à formação de biofilmes, embora haja controvérsias com relação a isso. Bactérias flageladas teriam melhores condições de aderir em ambientes com acúmulo de nutrientes, como aqueles próximos a um substrato sólido, chegando mais rapidamente ao local e tendo uma vantagem sobre competidores não móveis. Além disso, a motilidade de alguns microrganismos em biofilmes poderia influenciar na variabilidade genética ali encontrada (Zottola & Sasahara, 1994, Poulsen, 1999).

Conforme Whitchurch et al. (2002), a capacidade de alguns microrganismos, como *P. aeruginosa*, em transportar DNA para o meio extracelular através de vesículas (sem envolver lise) poderia estar diretamente relacionada à formação de biofilmes. A degradação do material genético por DNase I inibiu fortemente a adesão deste microrganismo, embora não tenha sido capaz de inibir seu crescimento. Esse estudo sugere que a presença de ácidos

nucléicos em exopolissacarídeos poderia ter uma importância além da meramente estrutural (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002).

É importante frisar também, que a formação dos biofilmes é controlada geneticamente, através de um processo complexo e multifatorial, onde condições nutricionais do meio e outras características ambientais seriam decisivas. Entre os possíveis reguladores na adesão irreversível estaria o gene *csrA*, inicialmente envolvido com o metabolismo de nitrogênio e cuja inibição foi capaz de permitir a adesão, mesmo na ausência de apêndices celulares. Além disso, existem especulações de que o glicogênio poderia ser a principal fonte de energia para a síntese de fatores de adesão na fase estacionária (Jackson et al., 2002).

### **2.3.1 Hidrofobicidade celular**

Há indícios de que a hidrofobicidade da célula bacteriana seja fundamental para sua adesão a uma superfície sólida, embora a formação de biofilmes seja um processo multifatorial. Di Martino et al. (2003) em seu estudo envolvendo *Klebsiella pneumoniae*, constataram uma correlação positiva entre hidrofobicidade da superfície celular e aderência a superfícies inertes, em um nível de significância inferior a 0,025. Além disso, existem diversos trabalhos relacionando hidrofobicidade celular com patogenicidade (Ljungh et al., 1985; Qadri et al., 1988).

Alguns autores têm reportado que a habilidade de uma superfície em fixar macromoléculas está relacionada à tensão superficial, à carga da superfície e a vários outros fatores, como pH e temperatura. Superfícies hidrofóbicas, com

energia de superfície relativamente baixa, seriam as maiores favorecedoras da adesão de microrganismos. Além disso, bactérias com uma superfície não hidrofóbica, teriam menor probabilidade de colonizar materiais hidrofóbicos, invertendo-se a situação em substratos hidrofílicos.

## **2.4 Adesão de microrganismos aos materiais**

A adesão de microrganismos aos materiais, como mencionado anteriormente, pode ou não ser considerada um problema, dependendo do ambiente em que essa adesão se manifesta. Em muitos casos, onde a carga microbiana planctônica (células isoladas em suspensão) não é considerada prejudicial, a desinfecção tornar-se-ia muito mais fácil, havendo a prevenção da adesão dos microrganismos. Em virtude disso, têm sido realizadas várias tentativas para identificar materiais que não promovam ou, até mesmo, impeçam a formação de biofilmes (Meyer, 2003).

Um dos materiais mais utilizados pela indústria de alimentos é o aço inoxidável. Ele pode ser considerado ideal para esse tipo de processamento, uma vez que é química e fisiologicamente estável em diversas temperaturas, de fácil limpeza e possui alta resistência à corrosão, embora apresente alto custo (Peng et al., 2001).

O polipropileno, por sua vez, é um material também resistente, mas de baixo custo. Por causa disso, está se tornando mais popular nas indústrias, sendo o constituinte de tanques, acessórios e superfícies de corte. Devido a isso, o estudo das possibilidades de contaminação cruzada de alimentos, determinando a

taxa de adesão bacteriana e a formação de biofilmes nesse tipo de material torna-se muito importante (Pompermayer & Gaylarde, 2000).

O vidro também é um material utilizado nas indústrias de alimentos. Devido a sua alta carga elétrica superficial, possui a capacidade de adsorver um grande número de solutos dissolvidos, os quais condicionam a formação dos biofilmes, por facilitar a adesão de microrganismos sobre eles (Zottola & Sasahara, 1994).

Entretanto, na classificação de diversos materiais quanto ao favorecimento da formação de biofilmes apresentada por Meyer (2003), o vidro aparece como o material que menos favorece a adesão microbiana, seguido de aço inoxidável, polipropileno, poli (cloreto de vinila) – PVC - entre outros. Porém, ainda segundo o autor, essa classificação deve ser interpretada com cautela, uma vez que os resultados podem variar conforme a espécie bacteriana em estudo, e com as condições de realização do teste.

Conforme Zottola & Sasahara (1994), a superfície celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em pH neutro é carregada negativamente, variando conforme o microrganismo e o ambiente de crescimento. Outros estudos demonstram que muitas superfícies inertes também são negativamente carregadas. Porém, a similaridade de cargas entre o microrganismo e o substrato provoca uma repulsão eletrostática entre eles. Devido a isso, a ocorrência de células que são atraídas ao substrato e que se mantêm aderidas a ele (sésseis), muitas vezes está relacionada à produção de exopolímeros de ancoragem, os quais não são influenciados pelas mesmas condições eletrostáticas.

Segundo Pompermayer & Gaylarde (2000), as bactérias aderem imediatamente às superfícies com as quais entram em contato, mesmo em baixas temperaturas. Obviamente, a produção de biomassa depende do tempo, mas devemos considerar a presença de microrganismos capazes de se reproduzir também em baixas temperaturas, como *Bacillus cereus*, por exemplo.

### **2.5 Fatores de virulência bacteriana e formação de biofilmes**

A adesão de bactérias a interfaces sólido/líquido é um fenômeno natural e uma importante propriedade associada com a habilidade da bactéria de formar biofilmes aderentes (Peng et al., 2001). Características de superfície da bactéria, incluindo hidrofobicidade da superfície celular e carga relativa da superfície, bem como a presença de estruturas celulares superficiais, flagelo, fímbria, exopolissacarídeos e ácidos nucléicos têm sido apontados por afetarem a adesão das bactérias (Zottola & Sasahara, 1994; Whitchurch et al. 2002). Isso demonstra que há uma possível relação entre a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilmes.

1.

#### **2.5.1 Fímbria**

Projeções como fímbria e pili superariam a força de repulsão eletrostática entre célula e substrato, podendo auxiliar tanto na adesão da célula, quanto na busca por regiões de maior estabilidade, onde a microcolônia pudesse se formar e iniciar o desenvolvimento do biofilme (Zottola & Sasahara, 1994). Di Martino et al. (2003) demonstraram a relação existente entre produção de fímbria

tipo 3 por *Klebsiella pneumoniae* e a capacidade desta em formar biofilmes. Linhagens da mesma bactéria não produtoras de fímbria tipos 1 e 3, por outro lado, não foram capazes de formar biofilmes após 48 horas de incubação.

A fímbria tipo 1 está diretamente relacionada à formação de biofilmes, uma vez que reconhece mono-oligossacarídeos, presentes em moléculas de glicoproteínas. Sua extremidade é afilada e contém principalmente as adesinas FimG e FimH, podendo a FimF também ser encontrada. Trata-se de uma importante determinante de virulência em *E. coli* e outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Sua produção depende de, pelo menos nove genes, contidos no grupo gênico tipo 1 (Soto & Hultgren, 1999).

O apêndice denominado “curli” é freqüentemente encontrado em *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis e se caracteriza por ser fino, irregular e altamente agregado. É uma estrutura muito estável, que requer tratamentos químicos bastante agressivos para desagregá-la, capaz de mediar a ligação entre o microrganismo e diversas proteínas, como fibronectina e plasminogênio. Assim, estaria diretamente relacionada à formação de biofilmes em implantes clínicos (Soto & Hultgren, 1999; Eiff et al., 2002).

Adesinas (glicoproteínas ou lipoproteínas em sua maioria) são proteínas que se unem especificamente a receptores complementares de tecidos, células procarióticas ou materiais abióticos. Podem estar associadas a apêndices filamentosos que protraem para o exterior da parede celular (fímbria e pili), ou ao glicocálice (adesinas não fimbriais ou não filamentosas). Cada microrganismo pode produzir mais de um tipo de adesina, e uma tentativa bem sucedida de

ligação ao substrato é capaz de ativar a expressão de outros genes no microrganismo, responsáveis por sua maior patogenicidade. Além disso, existem várias classes de adesinas, muitas delas espécie-específicas (Soto & Hultgren, 1999).

A síntese de adesinas, fímbrias ou não, é dependente de parâmetros ambientais, como temperatura, disponibilidade de nutrientes, ferro, entre outros. Assim, fímbrias tipo 1 seriam preferencialmente sintetizadas na temperatura corporal do hospedeiro, enquanto que as “curli”, teriam uma maior taxa de produção em temperatura ambiente (Emödy et al., 2003).

### **2.5.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS)**

O termo exopolissacarídeo, é um termo geral, utilizado para as duas formas existentes de produção de EPS: se a produção resultar numa camada extracelular compacta e firmemente ligada à parede, o termo utilizado é cápsula. Já a camada viscosa é uma camada de EPS desagregada e fracamente ligada à parede celular. Alguns microrganismos podem produzir ambos os tipos de EPS, enquanto outros sintetizam apenas um. Embora alguns microrganismos sejam capazes de sintetizar essas substâncias em qualquer condição de crescimento, é importante frisar que a produção de EPS e sua espessura estão diretamente relacionadas à concentração de nutrientes presentes e sua disponibilidade (Hassan et al., 2001).

Exopolissacarídeos são constituídos de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, cuja composição varia conforme o microrganismo (Hall-Stoodley &

Stoodley, 2002). Segundo Poulsen (1999), essas diferenças manifestam-se principalmente com relação a diferentes padrões de ligação entre os compostos mais comumente encontrados (glicose, frutose, manose, galactose, piruvato, ácido manurônico ou complexos baseados em ácido glucurônico).

Alterações na carga da superfície bacteriana e em sua energia livre têm sido atribuídas à produção de EPS. Estes atuam tanto na formação quanto na manutenção dos biofilmes, dando aos microrganismos muitas vantagens, em comparação com a vida planctônica, principalmente em termos de resistência a adversidades (Poulsen, 1999).

A produção de substâncias poliméricas também é importante quando se estuda as diversas interações entre microrganismos no biofilme. Isso, porque os EPS produzidos por um microrganismo podem influenciar decisivamente na adesão de outros ao biofilme, sendo relatadas também, interações entre os EPS produzidos por espécies diferentes e pertencentes ao mesmo ambiente. Embora a espécie que produza exopolímeros não os degrade em situações normais, é possível que uma espécie degrade as substâncias produzidas por outra, resultando na desagregação de partes do biofilme formado (Kumar & Anand, 1998).

## **2.6 Microrganismos patogênicos envolvidos na formação de biofilmes e analisados no presente estudo**

### **2.6.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-positiva. Trata-se de um microrganismo constituinte da microbiota nasal e epidérmica de muitos indivíduos, podendo chegar até os alimentos de diversas maneiras, principalmente através dos manipuladores. Devido à produção de enterotoxinas termoestáveis, está freqüentemente relacionado a casos de gastroenterites.

Enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixo peso molecular, altamente termoestáveis, resistentes à cocção ou a enzimas proteolíticas do trato intestinal, podendo ser sorologicamente classificadas de A a I. Uma dose de toxina equivalente à presença de  $10^5$  microrganismos por grama, será capaz de produzir sintomas de contaminação por *Staphylococcus*. Entre os sintomas decorrentes de intoxicações alimentares causadas por esse microrganismo - e que costumam aparecer poucas horas após a ingestão - estão náuseas, vômito e dor abdominal. A doença é geralmente autolimitante e costuma durar de 1 a 2 dias (Dinges et al., 2000).

*Staphylococcus aureus* também é relativamente resistente às condições do meio em que vive: pode tolerar a temperatura de 60° C por 30 minutos, é capaz de suportar altas pressões osmóticas, radiações, e até mesmo a dessecação, com alguns limites. Como estratégia de controle do crescimento desse microrganismo,

sugere-se a manutenção do alimento em baixas temperaturas (Dinges et al., 2000).

Esse microrganismo é associado à maioria dos casos de mastite em bovinos, comprometendo tanto a saúde do animal afetado, quanto a qualidade do leite produzido, acarretando em prejuízos ao produtor. A capacidade de *S. aureus* em colonizar a glândula mamária de vacas está fortemente relacionada à produção de fatores de virulência como a cápsula, que favorece sua adesão ao tecido, conferindo resistência à fagocitose e a tratamentos com antimicrobianos. Essa produção é manifestada por linhagens microbianas coagulases-positiva e negativa (Baselga et al, 1994; Vasudevan et al., 2003).

### **2.6.2 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* é um bastonete Gram-positivo e anaeróbio facultativo. É comumente encontrado em baixos níveis nos alimentos ( $< 10^2$  UFC/g). Trata-se de um microrganismo esporulado, muito comum no solo, em farinhas e freqüentemente encontrado no leite, onde é um dos responsáveis pela formação do coalho doce e de seu azedamento. Além disso, é considerado um dos principais microrganismos responsáveis pela qualidade do leite pasteurizado e de seus derivados (Peng et al., 2001).

Conforme Larsen & Jorgensen (1999), a germinação dos esporos de *B. cereus* psicrotóxicos pode ocorrer em temperaturas inferiores à mínima de crescimento. Além disso, sua viabilidade após a pasteurização chega a 95%. Em

seu estudo, constataram que a contaminação ambiental do leite *in natura* por *B. cereus* atua como fonte de endosporos, capazes de resistir ao processo de pasteurização, de germinar e inclusive de crescer exponencialmente à temperatura de 7 °C.

Em concentrações superiores a  $10^5$  UFC/g, é capaz de causar intoxicações alimentares, as quais são subdivididas em dois tipos: diarréico (com toxinas formadas durante crescimento no intestino delgado humano) e emético (onde as toxinas termoestáveis são pré-formadas no alimento). Ambos são autolimitantes e a recuperação ocorre dentro de 24 horas (Peng et al., 2001; Finlay et al., 2002).

Segundo Finlay et al. (2002), *B. cereus* é capaz de produzir diversos outros tipos de toxinas, como hemolisinas, fosfolipases e proteases. Porém, dentre as produzidas em alimentos, a toxina emética parece ser a mais perigosa, uma vez que são atribuídas a ela problemas de acentuado risco de morte, como falência hepática. Essa produção de toxina emética, diferentemente do observado para o gênero *Clostridium*, não coincide, obrigatoriamente, com o período de esporulação dos isolados de *B. cereus* e parece estar relacionada com a aeração, uma vez que condições anaeróbias não permitiram sua produção.

Seus esporos têm uma habilidade especial em aderir a superfícies de aço inoxidável, material comumente encontrado em indústrias de processamento de alimentos. A adesão de suas células pode levar à formação de biofilmes, os quais são mais resistentes à higienização (Peng et al., 2001). Segundo os autores,

a adesão dos endosporos de *B. cereus* às superfícies estaria diretamente relacionada com as condições ambientais.

### **2.6.3 *Escherichia coli***

Trata-se de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, bastonete Gram-negativo, anareóbia-facultativa que faz parte da flora intestinal normal de animais de sangue quente, como o homem. Devido a isso, tem uma utilização bastante grande como microrganismo indicador de contaminação fecal nos alimentos e na água. Entretanto, possui linhagens patogênicas, causadoras de diarreia bastante severa. Em seu estudo realizado no Rio de Janeiro, Da Silva et al. (2001) constataram taxas de coliformes fecais acima do permitido pela legislação para o leite pasteurizado tipo C, em três diferentes marcas estudadas. Altas contagens de *E. coli* que resistiram ao tratamento térmico foram igualmente observadas, evidenciando falhas no processo de tratamento térmico, talvez devido à formação de biofilmes, ou por baixa qualidade da matéria-prima (leite *in natura*).

Devido a sua capacidade em formar biofilmes espessos, *E. coli* tem sido muito utilizada em modelos para estudos desse tipo (Peterson & Pitt, 2000). Segundo Izquierdo & Hernández (2002), sua habilidade em formar biofilmes estaria diretamente relacionada com a disponibilidade de nutrientes no meio: quanto maior a disponibilidade, mais evidente o biofilme.

## **2.7 Controle da formação de biofilmes**

As alternativas mais apontadas para controlar a formação de biofilmes envolvem a construção de equipamentos sem locais de difícil acesso para limpeza/sanificação freqüente e monitoramento dos fatores necessários ao crescimento de microrganismos - temperatura, água e nutrientes – embora biofilmes também possam ser formados em ambientes com essas limitações. (Chmielewski & Frank, 2003). O tipo de material utilizado para a confecção dos equipamentos e a maneira como é feita sua higienização também são fundamentais, uma vez que equipamentos favorecem menos a adesão de microrganismos quando são novos, sem fendas, corrosão e outras alterações de superfície provocadas pelo uso (Kumar & Anand, 1998).

Existem diversas técnicas de limpeza e categorias de agentes químicos de sanificação passíveis de serem utilizadas pela indústria de alimentos, como halogênios, compostos de amônio quaternário, compostos fenólicos, ácidos, antibióticos e agentes gasosos (Yokoya, 1977). Sua forma de utilização/concentração dependerá das características do material a ser tratado, da composição das sujidades e da carga microbiana presente, além, é claro, da presença ou não de biofilmes. Nesse sentido, é preciso cautela na combinação dos agentes, para evitar incompatibilidade ou redução da eficiência (Chmielewski & Frank, 2003).

Uma alternativa ao uso dos métodos tradicionais de desalojar biofilmes na indústria, embora onerosa, são os complexos enzimáticos. Estes atuam na

matriz do biofilme, degradando sua estrutura exopolissacarídica e expondo os microrganismos ao efeito dos sanificantes (Johansen et al. 1997).

Segundo Meyer (2003), existem três estratégias básicas para tentar resolver o problema dos biofilmes: desinfecção antes da formação do biofilme, desinfecção após sua formação, ou utilização de materiais que não favoreçam a formação dos biofilmes, suplementando o meio com nutrientes. A melhor das estratégias no combate aos biofilmes, acaba sendo prevenir sua formação, utilizando combinações de agentes químicos de sanificação (oxidantes e com efeito residual) e efetuando procedimentos de limpeza freqüentemente (Mittelmann, 1998).

Entretanto, a adesão dos microrganismos é um processo muito rápido, ocorrendo em poucas horas, o que dificulta a adoção dessa estratégia em ambientes como o da indústria de alimentos, onde poderá ser inviável economicamente limpar os equipamentos com a freqüência necessária para prevenir sua adesão e a conseqüente elevação da resistência aos sanificantes (Pompermayer & Gaylarde, 2000; Meyer, 2003).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das amostras de leite *in natura***

O leite *in natura* foi coletado em uma pequena propriedade rural localizada no distrito de Linha Francesa Alta (Barão - RS) e armazenado em frasco estéril de 500 mL imediatamente após a ordenha. A amostra foi transportada refrigerada a 4 °C até o laboratório e processada em até 4 horas após a ordenha.

#### **3.2 Análise da aderência bacteriana aos materiais**

Foram pipetados 10 mL de leite *in natura* em tubos de ensaio estéreis contendo chapas retangulares (24 mm x 12 mm x 1 mm) dos diferentes corpos de prova: aço inoxidável (AISI 410 - Sulinox<sup>®</sup>), polipropileno (Bioplast<sup>®</sup>), pano de algodão (Ober S/A) e vidro (boro-silicato – Schott<sup>®</sup>). No total, foram 6 tubos para cada tipo de material, contendo, em cada, um corpo de prova. Aos dois tubos controle (tubos sem corpos de prova) foi aliquoteado somente leite, em igual quantidade. Após, metade dos tubos foi incubada em 10 °C e o restante em 25 °C.

### **3.2.1 Análise da formação de biofilmes e obtenção dos microrganismos de interesse**

As leituras foram realizadas após 2 h, 5 h e 8 h, contadas a partir do momento da incubação. Nelas, procedeu-se a contagem dos microrganismos aderidos (sésseis) aos corpos de prova pelo método de semeadura em superfície em PCA (Plate Count Ágar - HiMedia<sup>®</sup>).

Após os períodos de incubação, os corpos de prova foram retirados dos tubos e lavados com 10 mL de solução PBS 1x (Salina Fosfatada Tamponada, Apêndice 1) em cada face do material, para remover os microrganismos fracamente aderidos. Em seguida, foram inseridos em tubos contendo 5 mL de água peptonada estéril (0,1%) e submetidos à sonicação por 2 períodos de 10 minutos, em sonicador (USC 700 – Unique<sup>®</sup>) de 40 kHz  $\pm$  6 kHz (Locatelli, 2001).

O líquido sonicado foi diluído serialmente em água peptonada estéril (0,1%), até diluição  $10^{-3}$ . De todos os tubos, 100  $\mu$ L foram inoculados em placas de ágar PCA, para contagem total de microrganismos heterotróficos, em Ágar Baird-Parker, Ágar Cereus (não suplementado com Polimixina B) e Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB, Apêndice 1), para isolamento de *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*, respectivamente. Esse procedimento foi realizado para cada um dos tipos de material suporte incubado nas diferentes temperaturas, e em cada tempo de leitura.

As placas inoculadas foram incubadas por 24h em estufa a 30 °C (isolamento de *B. cereus*), a 37 °C (isolamento de *S. aureus* e *E. coli*) e por 18 h –

24 h a 25 °C, para contagem em PCA de microrganismos presentes no leite e aderidos aos materiais.

### **3.2.2 Leitura dos tubos controle**

Para estabelecer uma comparação entre o número de células aderidas e o número de células presentes no leite *in natura*, foi realizada, em cada uma das leituras, a contagem do número de UFC/mL do leite dos tubos sem corpo de prova. Primeiramente, foi feita uma diluição serial até diluição  $10^{-3}$ . Das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foi retirada uma alíquota de 100  $\mu$ L para contagem através de inoculação em ágar PCA pelo método de espalhamento.

### **3.2.3 Isolamento de microrganismos presentes nos biofilmes**

Colônias típicas e não típicas desenvolvidas nos meios de cultura seletivos foram isoladas e identificadas através de provas bioquímicas segundo MacFaddin (2000), e estocadas em glicerol (15%), a -20 °C.

Para a identificação de *S. aureus*, foi observada a morfologia e arranjo celulares através da coloração de Gram, testes da catalase, coagulase, fermentação anaeróbia do manitol, fermentação aeróbia de manose e trealose, teste da lipase.

Para a identificação de *E. coli* foi observada a morfologia e arranjo celulares através da coloração de Gram, produção de catalase, oxidase, utilização do citrato de sódio, fermentação da lactose, teste do vermelho de metila / Voges-

Proskauer, além de testes para verificar a produção de indol, gás sulfídrico e motilidade.

### **3.3 Teste dos fatores de virulência**

#### **3.3.1 Produção de cápsula**

O teste para evidenciar a produção de cápsula foi realizado conforme Seeley et al. (1991). Os isolados foram inoculados em caldo triptona de soja (TSB) e incubados a 37 °C por 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação, foi feito um esfregaço sobre lâmina de vidro, utilizando-se 2 gotas da suspensão bacteriana e 2 gotas de Vermelho Congo (0,5%), o qual foi seco em temperatura ambiente, sem fixação ao fogo. Uma vez seco, o esfregaço foi coberto com solução de Maneval, por 1 minuto, e lavado (Apêndice 1). Em seguida, procedeu-se à observação em microscopia óptica (1000 x em imersão).

O aparecimento de regiões não coradas ao redor das células, vermelhas, evidenciado pela presença de um fundo azul escuro, indica resultado positivo.

#### **3.3.2 Produção de hemolisina**

Realizado conforme Dias et al., 1994. Culturas bacterianas com 18 a 24 horas de incubação em ágar TSA (ágar Triptona de Soja) foram inoculadas em placas de ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro, através de picada com agulha de níquel-cromo estéril. Após, as placas foram incubadas a 37 °C, por

24/48 horas. A presença de zonas circulares de hemólise em volta das colônias bacterianas indica resultado positivo para o teste.

### **3.3.3 Produção de protease**

Teste descrito conforme Budi et al. (2000). Culturas bacterianas com 18 a 24 horas de incubação em ágar TSA, foram inoculadas através de picada em placas de Ágar Leite (Apêndice 1) e incubadas a 37 °C por 48 h. A presença de halos de degradação em volta das colônias indica resultado positivo.

### **3.3.4 Produção de fímbrias**

#### **3.3.4.1 Obtenção da suspensão de eritrócitos**

Sangue de carneiro foi centrifugado a 1000 rpm por 1 minuto, em centrífuga (2K15 – Sigma<sup>®</sup>). O sobrenadante foi desprezado e o pellet suspenso em solução PBS 1x estéril, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições. Após 3 lavagens, os eritrócitos foram diluídos a 1% em solução PBS.

#### **3.3.4.2 Preparação das células bacterianas**

Realizado conforme Truszczynsky & Osek (1987). As culturas bacterianas testadas tanto para presença de fímbria/adесinas, quanto para a tipificação desta estrutura, foram preparadas da seguinte maneira: cultivo em caldo TSB por 5 -6 h a 37 °C, seguido de inoculação em ágar CFA (Apêndice 1) e incubação por 24 h na mesma temperatura. Após, a cultura no ágar foi suspensa em solução PBS 1x, sendo a turbidez equivalente ao nível 4 da escala de Mac

Farland, determinada em fotocolorímetro microprocessado (Analyser 500M), com D.O. equivalente a 0,59 e  $\lambda$  aproximado de 620 nm.

#### **3.3.4.3 Teste para evidenciação da produção de fímbria/adesinas**

As suspensões foram diluídas em solução PBS 1x em microplacas com 96 cavidades até a razão 1:256, totalizando um volume final de 50  $\mu$ L por cavidade. A cada poço foram adicionados 50  $\mu$ L de suspensão de eritrócitos de carneiro a 1%, sendo o conteúdo homogeneizado e as microplacas incubadas a 4 °C por 18 h. A decantação incomum dos eritrócitos (evidenciada por um halo) em cavidades com título superior a 1:4 foi considerada resultado positivo. O teste foi realizado em triplicata, sendo as microplacas mantidas em banho de gelo durante sua execução.

#### **3.3.4.4 Método de aglutinação de MOS/PBS**

Para evidenciar a produção de fímbria tipo 1, foi utilizado o teste de Aglutinação ao MOS (manano oligossacarídeo). Foram homogeneizados 100 $\mu$ L da suspensão de células bacterianas e 100  $\mu$ L de suspensão de MOS a 0,1% em PBS. Após incubação por 30 minutos a 5 °C, foram aliqotados 20  $\mu$ L do homogeneizado em lâmina de vidro, seguindo-se a observação em microscopia óptica com aumento de 400x. Fímbrias do tipo 1 aglutinam MOS/PBS (Finucane et al., 1999).

### **3.4 Avaliação da hidrofobicidade bacteriana e dos materiais**

#### **3.4.1 Teste do sulfato de amônio**

Foi realizado como descrito por Schmidt et al., 1998. As amostras foram inoculadas em placas de ágar TSA e incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram diluídas em solução PBS 1x e testadas em uma lâmina de vidro a fim de se verificar se as amostras eram ou não auto-aglutinadoras. Para as não auto-aglutinadoras, uma nova suspensão bacteriana foi diluída, adicionando-se 15 µL de solução de sulfato de amônio contendo concentrações crescentes do sal. As concentrações utilizadas foram 0,5M, 1M, 1,5M, 2M, 2,5M e 3M.

O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de grumos nas amostras, num período máximo de 2 minutos.

#### **3.4.2 Mensuração do ângulo do raio da gota séssil**

Esse método, utilizado para avaliar a hidrofobicidade dos materiais vidro, polipropileno e aço inoxidável, foi realizado conforme determinado por Ludwicka et al. (1984) e Morra & Cassinelli (1996), no setor de fotodocumentação do Hospital e Clínicas de Porto Alegre.

Os corpos de prova de cada material foram lavados com detergente e enxaguados, imersos em álcool etílico 70%, enxaguados duas vezes em água destilada, secos em estufa e autoclavados a 121 °C por 15 min (Rossoni, 1997).

Volumes de 20 µL de água destilada estéril e leite integral UHT foram aliquotados sobre a superfície dos corpos de prova. Imediatamente após a

formação da gota na superfície, esta foi fotografada em máquina digital (Sony® Cyber-Shot 5MP modelo F707). Para cada corpo de prova foram tiradas 5 fotografias das gotas de cada um dos líquidos em diferentes partes da superfície. A distância e a posição da máquina fotográfica em relação aos corpos de prova foram mantidas constantes.

Das fotografias obtidas, mediu-se o ângulo resultante da inclinação da reta formada entre o raio da base de contato e a altura máxima da gota. Quanto maior o ângulo formado na gota de água destilada, maior a hidrofobicidade do material.

### **3.5 Teste de aderência *in vitro* de espécies bacterianas isoladas**

Após o isolamento, identificação e realização dos testes para produção dos fatores de virulência acima especificados, foram escolhidas uma cepa de *Escherichia coli* e uma de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite *in natura* e aderidas nos materiais testados, que se destacaram pela produção de fatores de virulência. Estas, juntamente com uma cepa de *Bacillus cereus* ATCC 33018 foram testadas entre si com o intuito de observar sua interação na formação de biofilmes nos materiais testados.

#### **3.5.1 Curva de crescimento**

Com o objetivo de estimar o número de células bacterianas presentes no teste de aderência *in vitro*, e também de comparar o metabolismo dos isolados

a serem utilizados, foram realizadas curvas de crescimento em TSB e em leite integral UHT (Locatelli, 2001, com modificações).

Os isolados foram inoculados em 5 mL de caldo TSB e incubados a 35 °C por 12 h em agitador de plataforma a 100 r.p.m. Após, a turbidez da cultura foi determinada em fotolorímetro com  $\lambda$  na faixa de 620 nm. Para obter turbidez de 0,01 nos erlenmayeres com 100 mL de cultura, utilizou-se a fórmula abaixo:

$$V_i \times D.O._i = V_f \times D.O._f$$

Onde:  $V_i$  = volume inicial  
 $D.O._i$  = densidade óptica inicial  
 $V_f$  = volume final  
 $D.O._f$  = Densidade óptica final

Nos períodos de tempo zero, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 12 h, 1 mL da cultura foi retirado e diluído serialmente em base 10 para contagem de células em TSA, com agitação dos tubos em agitador por 10 segundos. Utilizou-se o método de semeadura em gota (Miles & Mirsa, 1938), com inoculação de 20  $\mu$ L, em triplicata, para cada diluição. As placas foram incubadas a 30 °C por 12 h ou mais, para permitir melhor visualização das colônias.

O tempo médio de geração da cultura (G) foi calculado na fase de crescimento exponencial, como segue:

$$G = \frac{t}{3,322 (\log N_f - \log N_i)}$$

Onde:  $t$  = tempo transcorrido (em minutos)

$N_f$  = número final de células (em UFC/ mL)  
 $N_i$  = número inicial de células (em UFC/ mL)

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) representa a velocidade com que a cultura se desenvolve nas condições de cultivo sendo medida em UFC/ mL/h e calculada conforme a fórmula abaixo (Lemos et al., 1996):

$$\mu = \frac{1nN_f - 1nN_i}{t}$$

Onde:  $t$  = tempo transcorrido (em minutos)  
 $N_f$  = número final de células (em UFC/ mL)  
 $N_i$  = número inicial de células (em UFC/ mL)

Foram realizadas curvas de crescimento das três cepas utilizando como meio de cultura TSB e leite integral UHT, com acompanhamento de 12 horas e 6 horas, respectivamente, a 35 °C conforme descrito. Curvas de crescimento em leite integral UHT nas temperaturas de 10 °C e 25 °C tiveram monitoramento por semeadura em gota nos tempos zero, 2h, 4h, 6h e 8h.

### 3.5.2 Teste de aderência dos consórcios bacterianos

#### 3.5.2.1 Padronização do inóculo

Cinco culturas de cada cepa de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* ATCC foram incubadas por 12 h em 35 °C com agitação de 100 r.p.m. O volume de cultura necessário para obter a turbidez de 0,01 em 10 mL de leite integral UHT foi obtido com a fórmula “  $V_i \times D.O._i = V_f \times D.O._f$  ” para

cada um dos tubos incubados. Após a adição e homogeneização das culturas bacterianas nos tubos contendo leite, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada tubo. Esta foi então diluída serialmente com base 10 e plaqueada por semeadura em gota em TSA, sendo 3 gotas de 20 µL para cada diluição.

Após 12h de incubação das placas em 30 °C, procedeu-se à contagem das UFC. Para cada espécie bacteriana, obteve-se cinco valores em UFC/ mL correspondentes à turbidez 0,01. O número de UFC/mL definido como inóculo inicial foi a média dessas 5 repetições. No teste de aderência *in vitro*, a turbidez do inóculo inicial variou para cada microrganismo, para obtermos igualdade de UFC/mL entre as cepas. A turbidez ajustada para cada microrganismo - *Escherichia coli* (0,0001), *Staphylococcus aureus* (0,0001) e *Bacillus cereus* (0,005) – correspondeu a 10<sup>5</sup> UFC/mL.

### **3.5.2.2 Teste de aderência *in vitro***

Leite integral UHT contaminado artificialmente com 10<sup>5</sup> UFC/mL de *E. coli*, *S. aureus* ou *B. cereus* foi incubado por 1 h a 35 °C com agitação de 100 rpm. Após, foi aliqotado com volume final de 9 mL em tubos contendo corpos de prova compostos por vidro, polipropileno e aço inoxidável, sendo um corpo de prova por tubo. Em cada tubo foi adicionada uma combinação de bactéria entre as sete possíveis: somente *E. coli*; somente *S. aureus*; somente *B. cereus*; *E. coli* / *S. aureus*; *E. coli* / *B. cereus*; *S. aureus* / *B. cereus* ou *E. coli* / *S. aureus* / *B. cereus*.

Tubos contendo cada consórcio bacteriano foram incubados nas temperaturas de 10 °C e 25 °C. As leituras foram realizadas após 4 h e 8 h de

contato das células com os materiais. Nestas, os corpos de prova foram retirados, lavados com 10 mL de solução PBS em cada face para remover células fracamente aderidas, inseridos em tubos de água peptonada estéril e sonicados por 16 minutos para desalojar as células aderidas. Então, o líquido sonificado foi diluído serialmente e 20 µL foram semeados em triplicata.

Para verificar a adesão das cepas em cultura pura utilizou-se ágar TSA. Para diferenciar as espécies bacterianas nos consórcios, utilizou-se plaqueamento em ágar EMB (*E. coli*), ágar sal manitol (*S. aureus*) e ágar cereus (*B. cereus*). As placas foram incubadas em 30 °C, por 12 h.

Os microrganismos foram adicionados em volumes iguais, contendo 10<sup>5</sup> UFC/mL e cada combinação bacteriana foi testada em triplicata para cada condição tempo/temperatura/material. O volume de leite utilizado nos experimentos pertence ao mesmo lote e foi submetido a controle de esterilidade através da semeadura de 100 µL do líquido em ágar TSA com incubação das placas por 48 h em 30 °C.

### **3.6 Visualização dos microrganismos aderidos**

#### **3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A MEV foi utilizada para avaliar qualitativamente a adesão dos microrganismos e a formação do filme condicionante na superfície dos materiais. Foi avaliada a adesão dos microrganismos presentes no leite *in natura* nos tempos de 2 h, 5 h e 8 h e nas temperaturas de 10 °C e 25 °C. Corpos de prova não

submetidos aos ensaios de adesão também foram observados em MEV, para avaliar características superficiais dos materiais.

A forma de fixação e desidratação das amostras utilizada foi a Desidratação por Ponto Crítico, com protocolo fornecido pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, onde também foram obtidas as imagens. Após a retirada dos corpos de prova do leite *in natura*, estes foram lavados com 10 mL de solução PBS 1x em cada face e imersos em solução fixadora contendo glutaraldeído. Após um período mínimo de 7 dias de fixação, os corpos de prova (amostras) foram lavados por 3 vezes com solução de lavagem contendo tampão fosfato 0,2M e água destilada na proporção de 1:1. Em cada lavagem os corpos de prova foram imersos na solução de lavagem por 30 minutos (Apêndice 1).

Em seguida, procedeu-se a desidratação com concentrações crescentes de acetona (30% por 10 min; 50% por 10 min; 70% por 10 min; 90% por 10 e 20 min; 100% por 10 e 20 min). Após atingida a concentração de acetona 100%, as amostras foram inseridas no Secador de Ponto Crítico (Critical Point Dryer – Balzers<sup>®</sup> CPD030), para substituir a acetona do interior das células por CO<sub>2</sub>. Uma vez finalizado o processo de desidratação, as amostras foram metalizadas com alvo de ouro (Sputter Coater - Balzers<sup>®</sup> SCD050) para permitir sua visualização no microscópio.

As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (JSM 5800 – JEOL<sup>®</sup>) com aumento médio de 2000 vezes.

### 3.6.2 Microscopia de epifluorescência

A microscopia de epifluorescência foi utilizada na observação dos consórcios bacterianos aderidos aos materiais vidro, polipropileno e aço inoxidável. Os corpos de prova foram cobertos por 3 minutos com solução de laranja de acridina (0,025%, Apêndice 1), sendo o líquido escoado e a visualização realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus® BX41), com aumento de 1000 x em imersão (Rossoni, 1997). Foram observados corpos de prova não submetidos ao ensaio de adesão (controle negativo de fluorescência), os microrganismos em cultura pura e os consórcios que se diferenciaram estatisticamente dos demais pela maior adesão. Células vivas ou ativas são visualizadas em cor-de-laranja, enquanto que células mortas ou inativas aparecem coradas de verde.

### 3.6.3 Análise estatística

Utilizou-se o teste  $\chi^2$ , complementado ou não pela Análise de Resíduos Ajustados, para determinar a relação entre produção de fatores de virulência e material testado, excluindo-se o vidro, devido a seu baixo número amostral. Na avaliação da hidrofobicidade celular entre *Enterobacteriaceae* e o gênero *Staphylococcus*, utilizou-se o Teste t. A ANOVA (Análise de Variância) complementada com a comparação múltipla de médias pelo método de Tukey, foi utilizada para avaliar a adesão dos microrganismos nos consórcios e as contagens de microrganismos do ensaio de adesão em leite *in natura* (Apêndices 5 a 7).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento e caracterização dos microrganismos aderidos aos materiais de estudo

Foram obtidos 103 isolados bacterianos aderidos aos materiais, pertencentes a diversas espécies (Tabela 1). A partir da escolha de colônias típicas e não típicas de *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus* nos meios semeados, buscando contemplar as diferentes morfologias coloniais presentes nas placas, foram obtidos 59 isolados do pano de algodão, 23 do polipropileno, 17 do aço inoxidável e 04 do vidro. Todos foram submetidos aos testes de produção de fatores de virulência e hidrofobicidade celular.

A maioria dos isolados Gram-negativos pertence à família *Enterobacteriaceae* - com predominância dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Serratia* - enquanto que os Gram-positivos foram representados pelo gênero *Staphylococcus*, ressaltando a presença de *Staphylococcus* coagulase-negativos.

TABELA 1: Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de biofilmes formados em corpos de prova compostos de vidro, polipropileno, aço inoxidável e pano de algodão em contato com leite *in natura*.

<b>Gram-negativas (n=58)</b>	<b>Número de isolados</b>
<i>Cedecea</i> sp.	1
<i>Comamonas</i> sp.	1
<i>Enterobacter asburiae</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	6
<i>Enterobacter hormaechae</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	14
<i>Hafnia alvei</i>	3
<i>Kluyvera</i> sp.	2
<i>Pseudomonas</i> sp.	6
<i>Serratia fonticola</i>	10
<i>Serratia plymuthica</i>	5
<i>Xanthomonas</i> sp.	5
<b>Gram-positivas (n=45)</b>	<b>Número de isolados</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	13
<i>Staphylococcus caprae</i>	6
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	8
<i>Staphylococcus intermedius</i>	11
<i>Staphylococcus kloosii</i>	2
<i>Staphylococcus lentus</i>	2
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	2
<b>Total de isolados</b>	<b>103</b>

Ao correlacionar os microrganismos isolados com seus respectivos materiais, temperaturas e tempos (Tabela 2) observou-se que a adesão de Gram-positivos (*Staphylococcus*) foi maior que a dos Gram-negativos em até 5 horas de contato, em ambas as temperaturas testadas. Além disso, percebeu-se que os Gram-positivos tiveram uma taxa de adesão constante ao longo do tempo, enquanto que os Gram-negativos apresentaram padrão de adesão bifásico - número inicial de células baixo, seguido por abrupta elevação com o passar do

tempo – principalmente na temperatura de 25, superando os Gram-positivos em número de células após 8 horas de contato, também em ambas as temperaturas.

TABELA 2: Distribuição dos 103 isolados de biofilmes formados em leite *in natura*, com relação ao tempo de contato do leite com os materiais e à temperatura de incubação.

<i>Tempo de contato</i>	<i>Gram-positivos</i>	<i>Gram-negativos</i>
<b>Temperatura de 10 °C</b>		
2h	3	1
5h	2	0
8h	3	9
<b>Total de isolados</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
<b>Temperatura de 25 °C</b>		
2h	6	0
5h	13	3
8h	18	45
<b>Total de isolados</b>	<b>37</b>	<b>48</b>

Os gêneros bacterianos encontrados no presente estudo vêm ao encontro de constatações realizadas em outros estudos, que apontam os gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium* e *Escherichia* como tendo uma maior tendência em formar biofilmes (Poulsen, 1999; Pompermayer & Gaylarde, 2000).

O isolamento de microrganismos potencialmente patógenos como *E. coli* e *S. aureus*, além de microrganismos potencialmente patógenos emergentes, pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos, merece atenção. Embora mais associado à patogenia em caprinos, existem trabalhos relatando a presença de *Staphylococcus caprae* na microbiota humana, sendo, inclusive, responsável por infecções em pacientes com implantes cirúrgicos (Vandenesch et al., 1995; Allignet et al., 1999; Allignet et al., 2001). Nesse caso, sugere-se que este microrganismo tenha advindo dos manipuladores ou utensílios contaminados, já no momento da ordenha.

#### **4.2 Produção de fatores de virulência**

Dentre os 103 isolados, 57 (55,3%) foram produtores de hemolisinas, sobressaindo-se o gênero *Staphylococcus*. Todos os isolados de *S. aureus* foram produtores. Vinte e um isolados produziram proteases (20,3%), muitos pertencentes a gêneros conhecidamente produtores de diversas enzimas, como *Pseudomonas* sp. e *Xanthomonas* sp. Cinquenta e dois isolados (50,4%) foram produtores de cápsula, em sua maioria Gram-negativos (48 isolados). Dos 13 isolados de *E. coli*, 11 foram positivos. Cinquenta isolados (48,5%) apresentaram positividade no teste de microhemaglutinação para detecção de fímbria/adesinas. Destes, 5 isolados foram produtores de fímbria tipo 1 no teste com MOS/PBS, todos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Apêndice 2). As bactérias Gram-negativas representaram 70% dos isolados produtores de fímbria/adesinas.

A presença de fímbrias, além de alterar propriedades físico-químicas das células, também está diretamente relacionada na interação dos microrganismos com as superfícies. Sabe-se que elas estabilizam o contato das células com superfícies hidrofóbicas, tornando os microrganismos que a possuem melhores formadores de biofilmes (Otto et al., 1999a; Otto et al., 1999b).

#### **4.3 Avaliação da hidrofobicidade bacteriana (Teste do sulfato de amônio)**

Este teste tem como princípio que a precipitação de células em baixas concentrações de sal é diretamente proporcional a sua hidrofobicidade (Lindahl et al., apud Hood & Zottola, 1995, p.11). Foram considerados positivos os isolados que aglutinaram em até 3M de sulfato de amônio. Dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, 86,6% e 84,4% foram positivos para o teste de hidrofobicidade, respectivamente, sendo 26,6% o percentual de Gram-positivos aglutinantes em concentrações de sulfato de amônio iguais ou inferiores a 1M, enquanto que para os Gram-negativos esse valor foi de 34,4%.

A diferença na hidrofobicidade celular de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Staphylococcus* não foi estatisticamente significativa ( $\alpha=0,05$ ), quando comparados os valores obtidos para cada isolado.

Embora seja influenciada pela produção de exopolissacarídeos e proteínas de superfície como adesinas e flagelos, a hidrofobicidade entre os grupos, considerando apenas o total de positivos e negativos, não apresentou diferença significativa, sugerindo que existam outros fatores determinando essa

característica, como o tipo de exopolissacarídeos produzidos e até mesmo a composição do meio de cultura utilizado no teste da hidrofobicidade (Ljungh et al., 1985; Paul & Jeffrey, 1985; Gross & Logan, 1995; Hassan & Frank, 2004).

Entretanto, na comparação entre os isolados Gram-positivos e Gram-negativos com hidrofobicidade mais elevada (aglutinantes em até 0,5M de sulfato de amônio), houve associação entre tipo de parede celular e hidrofobicidade ( $\alpha=0,05$ ) sendo os Gram-negativos mais hidrofóbicos do que os Gram-positivos (24,1% e 8,8% dos isolados, respectivamente).

A hidrofobicidade média dos microrganismos isolados e aderidos ao pano de algodão foi de 1,45M; dos isolados do polipropileno foi 1,37M; do vidro, 1,12M e do aço inoxidável 1,0M. Porém, essa associação não foi estatisticamente significativa ( $\alpha=0,05$ ). Não foram contabilizados os isolados auto-aglutinantes e os que não aglutinaram em até 3M, maior concentração de sulfato de amônio prevista no teste. No grupo dos Gram-positivos, 8,8% foram auto-aglutinantes e no dos Gram-negativos, 12,0%.

Os resultados acima são condizentes com a literatura, ao corroborar a hipótese de que a hidrofobicidade celular é importante na adesão aos materiais testados, já que ambos os grupos foram capazes de aderir e apresentaram altas taxas de positividade para o teste. Entretanto, a atuação de outros componentes da superfície bacteriana, e não só a hidrofobicidade, deve ser considerada neste processo, uma vez que a adesão celular mediada por interações hidrofóbicas nem sempre tem grande relevância (Hood & Zottola, 1995; Sinde & Carballo, 2000; Hassan & Frank, 2004,).

#### **4.4 Caracterização dos materiais quanto à aderência de microrganismos**

##### **4.4.1 Análise da formação de biofilmes nos diferentes materiais**

A partir das contagens em PCA (Apêndice 3), observou-se que o pano foi o material que melhor favoreceu a adesão dos microrganismos e cuja diferença de UFC/cm<sup>2</sup> aderidas em relação aos outros materiais é estatisticamente significativa ( $\alpha=0,05$ ; Figuras 3 e 4). O polipropileno foi o segundo que mais favoreceu a adesão, seguido por vidro e aço inoxidável, nesta ordem. Embora tenham variações expressivas nas contagens de UFC aderidas, principalmente o polipropileno em relação ao aço inoxidável e ao vidro, tais diferenças não foram estatisticamente significativas.

O vidro e o aço inoxidável apresentaram contagens e padrões de adesão bastante similares na temperatura de 10 °C. Já na temperatura de 25 °C isso não se repetiu, sendo que após 8 h de contato, a diferença no número de células aderidas aos materiais foi de quase 1 log/cm<sup>2</sup>. Embora esses materiais apresentem contagens baixas de microrganismos aderidos em 10 °C, mesmo após 8 horas de contato, a provável inexistência de um biofilme propriamente dito merece atenção. Segundo Hood & Zottola (1995), contagens de células aderentes na faixa de 10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup> não constituem um verdadeiro biofilme. Porém, o potencial de biotransferência desse ambiente – ou seja, a simples presença de microrganismos aderidos em uma superfície que poderiam eventualmente levar à contaminação dos alimentos - deve ser levado em consideração e interpretado como um problema a ser resolvido. Além disso, o fato de bactérias aderidas serem mais

resistentes aos sanificantes do que as em suspensão (Peng et al., 2001) já é capaz de gerar uma situação talvez tão indesejável para a indústria quanto a presença de biofilmes maduros, porque em ambos os casos haverá maior sobrevivência de microrganismos.

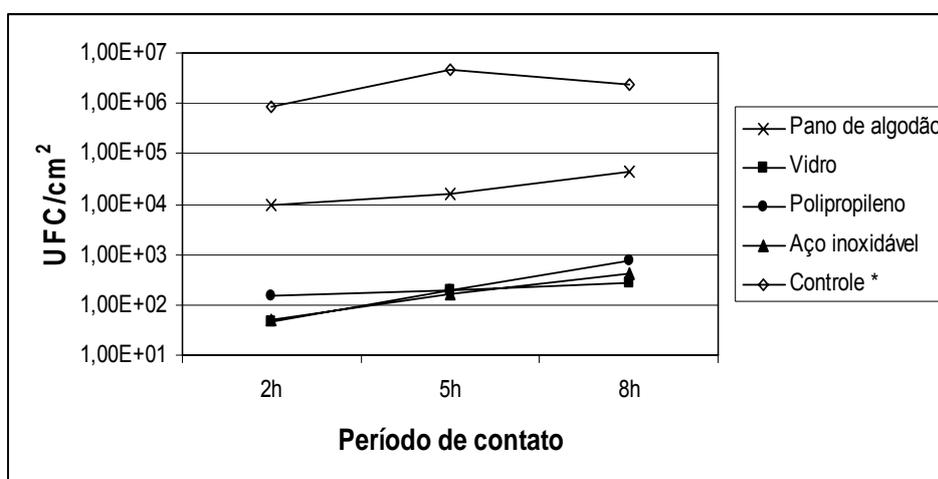


FIGURA 3: Contagem de bactérias presentes no leite *in natura* e aderidas aos diferentes materiais após 2 h, 5 h e 8 h de contato, na temperatura de 10 °C. \* O controle representa o número de células bacterianas contidas no leite, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

Embora as contagens bacterianas de células aderidas aos materiais tenham indicado o aço inoxidável e o vidro como os que menos favoreceram a adesão, é importante salientar que esse resultado só pode ser considerado para as condições do presente estudo. Além disso, a adesão quase nula apresentada nas primeiras horas de contato desses materiais não reflete sua incapacidade em permitir a formação de biofilmes, mas sim, que talvez provoquem um retardamento

na adesão dos microrganismos, levando mais tempo para que o biofilme se forme (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002).

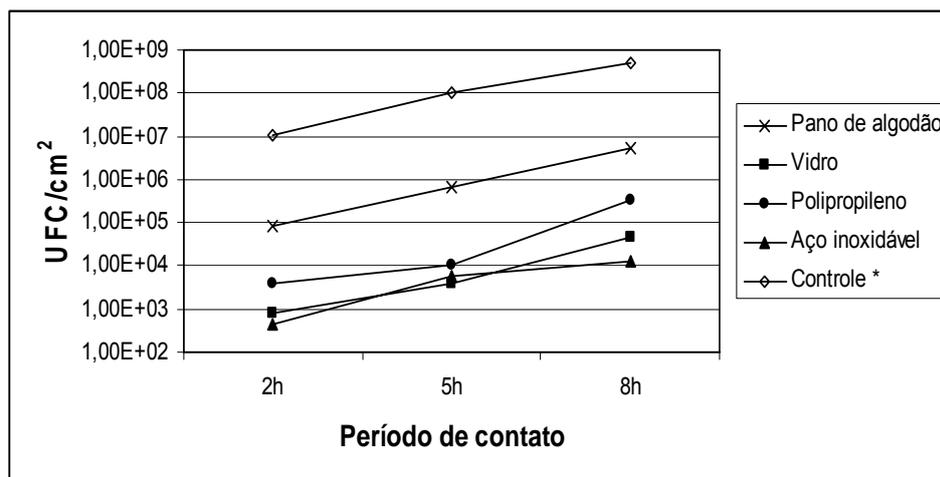


FIGURA 4: Contagem de bactérias presentes no leite *in natura* e aderidas aos diferentes materiais após 2 h, 5 h e 8 h de contato, na temperatura de 25 °C. \* O controle representa o número de células bacterianas contidas no leite, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

O resultado das contagens de microrganismos aderidos aos materiais é corroborado por trabalhos semelhantes, como o de Suárez et al. (1992), que encontraram o vidro como o material que menos favorece a adesão de psicrotóxicos, em comparação ao aço inoxidável e à borracha. Neste trabalho, os autores, inclusive, observaram que a aderência bacteriana diminuiu em todos os materiais quando utilizaram leite como meio líquido, ao invés de solução de Ringer.

De uma maneira geral, na temperatura de 25 °C foi observado um aumento no número de células aderidas superior à taxa de elevação do número de células contidas no leite, principalmente após 5 horas de contato (Tabela 3).

Na temperatura de 25 °C, materiais como polipropileno e vidro inicialmente tiveram uma taxa de células aderidas inferior à taxa de elevação do controle. Porém, entre 5h e 8h de contato, o aumento do número de células aderidas foi muito superior ao aumento do número de células no leite, o que caracteriza um processo de adesão bifásico, especialmente com relação ao polipropileno. O aço inoxidável foi o único material com número de células aderidas proporcionalmente maior em todos os tempos avaliados para essa temperatura.

Em trabalhos que envolvem enumeração de células aderidas através da contagem em placa, a etapa de desalojamento é fundamental. Parizzi et al. (2004), comparando microscopia de epifluorescência e contagem em placa como métodos de enumeração de células aderidas, constataram que, em geral, a contagem em placa apresentava número de células inferior ao da contagem em microscopia, resultado atribuído à falha na etapa de desalojamento dos biofilmes, a qual se dava através de agitação por 2 minutos. Locatelli (2001), através de visualização em microscopia eletrônica de varredura, constatou que a sonicação por dois períodos de 10 min (frequência de 40 kHz  $\pm$  6 kHz) foi eficaz na remoção das células bacterianas aderidas, sem, contudo, afetar sua viabilidade. Assim, optou-se pelo método de sonicação em detrimento de outros.

TABELA 3: Proporção de aumento das contagens de células bacterianas aderidas entre os tempos de contato em relação ao número de células bacterianas do leite (controle) nas temperaturas de 10 °C e 25 °C. Poliprop = Polipropileno.

<i>Temperatura de 10 °C</i>					
<b>Tempo</b>	<b>Pano de algodão</b>	<b>Poliprop.</b>	<b>Vidro</b>	<b>Aço inoxidável</b>	<b>Controle</b>
Entre 2h e 5h	1,6 vezes	1,2 vezes	4,2 vezes	3,3 vezes	2,2 vezes
Entre 5h e 8h	2,8 vezes	3,6 vezes	1,4 vezes	2,5 vezes	2,7 vezes
<i>Temperatura de 25 °C</i>					
<b>Tempo</b>	<b>Pano de algodão</b>	<b>Poliprop.</b>	<b>Vidro</b>	<b>Aço inoxidável</b>	<b>Controle</b>
Entre 2h e 5h	8,4 vezes	2,7 vezes	4,6 vezes	12,7 vezes	8,9 vezes
Entre 5h e 8h	7,5 vezes	30,8 vezes	12,2 vezes	21,5 vezes	5,3 vezes

#### 4.4.2 Hidrofobicidade dos materiais

##### 4.4.2.1 Mensuração do ângulo do raio da gota séssil

A partir dos ângulos medidos (Tabela 4 e Figura 5), observou-se que o aço inox foi o material mais hidrofóbico, seguido pelo polipropileno e o vidro, nessa ordem.

A hidrofobicidade do aço inox é controversa na literatura: alguns trabalhos o citam como sendo um material hidrofílico (Barnes et al., 1999; Moretro et al., 2003) outros, relatam que é hidrofóbico (Sinde & Carballo, 2000; Peng et al., 2001; Teixeira et al., 2005). Como a maioria dos trabalhos estudou os mesmos materiais (aço inox AISI 304 e AISI 316), chegando a resultados opostos com relação à hidrofobicidade, é possível que haja diferenças em vários aspectos: em relação ao método de análise e interpretação dos dados, em relação ao acabamento final ou manufatura do produto, ou mesmo em relação à tipificação do material.

Embora materiais de natureza hidrofóbica sejam apontados como os maiores favorecedores de adesão bacteriana (Sinde & Carballo, 2000; Djordjevic et al., 2002), o aço inoxidável foi o material mais hidrofóbico aqui estudado e obteve a menor taxa de adesão, resultado, este, corroborado pela literatura. Além disso, é importante ressaltar que os ângulos médios aqui obtidos para as gotas de água no vidro coincidem com valores encontrados anteriormente (Cerca et al., 2005) eliminando, assim, a possibilidade de erro na execução e interpretação do ângulo do raio da gota séssil.

TABELA 4: Ângulos do raio da gota séssil medidos para cada material em relação ao líquido gotejado (leite e água). Os valores representam a média de 5 repetições.

<b>Gota de água destilada</b>		<b>Gota de leite integral UHT</b>	
Material	Ângulo médio	Material	Ângulo médio
Aço inoxidável	72,1°	Aço inoxidável	65,9°
Polipropileno	71,3°	Polipropileno	68,8°
Vidro	31,6°	Vidro	29,0°

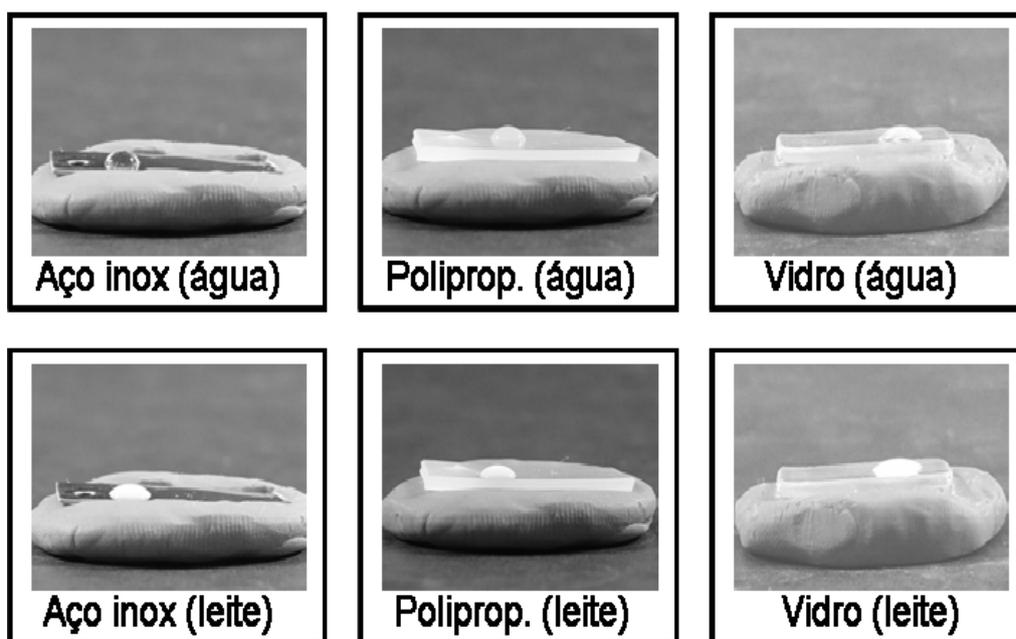


FIGURA 5: Visualização da gota séssil para os materiais vidro, polipropileno (poliprop.) e aço inoxidável, com variação do líquido gotejado (água e leite). Os ângulos foram medidos a partir das imagens. (Porto Alegre, 2005).

#### **4.5 Associação entre as características da célula bacteriana e sua adesão aos materiais estudados**

A análise estatística demonstrou haver associação entre presença de cápsula e adesão no pano de algodão, enquanto resultado oposto foi obtido para o polipropileno, também em nível de significância de 5%. A presença de fímbria não foi significativamente associada aos materiais testados.

A associação entre cápsula e adesão em pano de algodão vem justificar o maior número de isolados da família *Enterobacteriaceae* nele encontrados. Por ser um material poroso e com fendas, proporciona abrigo aos microrganismos e possivelmente faz com que estes levem menos tempo para iniciar ou persistir na síntese de exopolissacarídeos, ingressando na fase irreversível de adesão. Como os *Staphylococcus* comumente não produzem essa estrutura, poderiam ser mais facilmente removidos das fendas do pano de algodão com a lavagem.

No presente trabalho, a hidrofobicidade média dos microrganismos foi similar à hidrofobicidade dos materiais de que foram isolados. Do aço inoxidável, o mais hidrofóbico, foram isolados microrganismos igualmente mais hidrofóbicos (em média 1,0M). Do polipropileno, segundo mais hidrofóbico, foram isolados microrganismos aderidos com hidrofobicidade menor (1,37M). Porém, essa associação não pôde ser estabelecida para o vidro - mais hidrofílico dos materiais e hidrofobicidade média de 1,12M - possivelmente devido ao baixo número de isolados desse material (n=4). A hidrofobicidade foi capaz de diferenciar Gram-

positivos de Gram-negativos (estes foram estatisticamente mais hidrofóbicos, na comparação entre isolados aglutinantes em até 0,5M).

O polipropileno, por não ser tão hidrofóbico quanto o aço inoxidável, pode ter favorecido a adesão de bactérias com hidrofobicidade intermediária, além das células com alta hidrofobicidade, daí a explicação das contagens superiores encontradas em relação às do aço inoxidável. Segundo Sommer et al. (1999), a interação microrganismo-superfície difere conforme a hidrofobicidade do material. Além das características do material, é preciso considerar propriedades bacterianas como carga, hidrofobicidade e apêndices celulares (Bower et al., 1996), cuja importância na adesão varia conforme a espécie de microrganismo em estudo (Chmielewski & Frank, 2003).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* isoladas nesse trabalho produziram uma maior quantidade de fatores de adesão e foram encontradas com maior incidência no pano de algodão. Todavia, no polipropileno, sua adesão foi significativamente menor que a do gênero *Staphylococcus* (Tabela 5). Como possíveis razões para explicar esse fato, temos o envolvimento de outros fatores, como características físico-químicas da superfície – hidrofobicidade, carga superficial - capazes de proporcionar filmes condicionantes de diferentes naturezas, provocando ou não a atração das células bacterianas para próximo da superfície, conforme já observado por McEldowney & Fletcher (apud Chmielewski & Frank, 2003, p.24) e Criado et al. (1994).

TABELA 5: Distribuição dos fatores de virulência produzidos pelos isolados bacterianos de cada material, excetuando-se os isolados não enquadrados nos grupos. MATER.= material; CÁP = cápsula; FÍM/ADES = fímbria/adensinas; HIDRO. = hidrofobicidade; Poliprop.= polipropileno.

<i>Enterobacteriaceae</i> (n=46)				<i>Staphylococcus</i> (n=45)			
MATER.	CÁP	FÍM/ ADES	HIDRO.	MATER.	CÁP	FÍM/ ADES	HIDRO.
<b>Pano de algodão</b> n=38	32/38 (84,2%)	25/38 (65,8%)	33/38 (86,8%)	<b>Pano de algodão</b> n=15	2/15 (13,3%)	3/15 (20%)	12/15 (80%)
<b>Poliprop.</b> n=2	2/2 (100%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	<b>Poliprop.</b> n=17	0	8/17 (47%)	16/17 (94,1%)
<b>Aço inox</b> n=6	5/6 (83,3%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	<b>Aço inox</b> n=10	2/10 (20%)	3/10 (30%)	8/10 (80%)
<b>Vidro</b> n=0	0	0	0	<b>Vidro</b> n=3	0	1/3 (33,3%)	3/3 (100%)
<b>Isolados positivos</b>	39 (84,7%)	32 (69,5%)	41 (89,1%)	<b>Isolados positivos</b>	4 (8,8%)	15 (33,3%)	39 (86,6%)

O leite possui bactérias com diferentes hidrofobicidades e características superficiais (Bower et al., 1996), sendo impossível determinar esses fatores para todos os microrganismos enumerados nas contagens em PCA. O número de células de cada espécie e seu estado fisiológico no momento da análise também parecem afetar a adesão dos microrganismos (Stone & Zottola, 1985a; Boulange-Petermann, 1996), e tampouco puderam ser determinados. Assim, baseados na interpretação estatística dos dados, pode-se sugerir que a

natureza do filme condicionante formado no polipropileno não favoreceu a adesão de células produtoras de cápsula, uma vez que elas possivelmente estavam presentes e aderiram aos outros materiais pesquisados.

O papel dos filmes condicionantes ainda não foi muito bem estabelecido no estudo da formação de biofilmes. Segundo Mittelman (1998), a adsorção dos componentes do leite ocorre entre 5 e 10 segundos de contato com a superfície inerte. Alguns trabalhos apontam que filmes condicionantes formados a partir de algumas proteínas contidas no leite podem vir a diminuir a adesão de *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* às superfícies de aço inox e borracha, como é o caso de caseína e 8-lactoglobulina (Helke et al., apud Kumar & Anand, 1998, p.11).

Esses resultados foram corroborados por Hood & Zottola (1995) quando verificaram a aderência de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* a aço inoxidável pré-condicionado com leite integral, leite integral achocolatado e leite diluído. Em seus experimentos, verificaram que o leite diluído foi o que mais favoreceu a adesão dos microrganismos. Entre outras proteínas que podem vir a dificultar a adesão de microrganismos, estão albumina sérica bovina, gelatina, fibrinogênio e pepsina (Fletcher, apud Barnes et al., 1999, p.4546; Bower et al., 1996; Wong, 1998).

Filmes condicionantes formados por lactose ou proteínas do soro parecem favorecer a adesão de microrganismos aos materiais (Helke et al. 1993, apud Hood & Zottola, 1995, p.14). Obviamente, equipamentos que não foram corretamente higienizados, e permanecem com resíduos de leite em sua

superfície, servem de fonte de nutrientes para qualquer microrganismo que ali possa aderir.

Verran & Jones (apud Chmielewski & Frank, 2003, p.24) observaram que proteínas hidrofóbicas aderiram com maior frequência em materiais com elevada energia superficial livre, enquanto ácidos graxos aderiram melhor em materiais poliméricos hidrofóbicos. Embora os indícios apontem que filmes condicionantes, de maneira geral, favorecem a adesão de microrganismos, pouco se estuda em relação ao controle de sua formação ou alteração (Mittelman, 1998).

A capacidade de certos microrganismos atuarem como condicionadores de superfície também deve ser considerada. É o caso dos colonizadores primários, produtores de grande quantidade de EPS, que acabam favorecendo a adesão de outros microrganismos à superfície. Como exemplo clássico, está a interação entre *Pseudomonas fragi* e *Listeria monocytogenes*, na qual a última apresentou uma taxa de adesão muito superior do que quando em cultura pura (Sasahara & Zottola apud Hood & Zottola, 1995, p.14). Ainda segundo os autores, a presença de colonizadores primários de superfície é rotineira na indústria de alimentos, acarretando na aderência de patógenos passíveis de contaminar os alimentos.

## 4.6 Teste de aderência *in vitro* de espécies bacterianas isoladas

### 4.6.1 Curvas de crescimento

Para o teste de adesão *in vitro* escolheu-se um isolado de *E. coli* e um de *S. aureus* que se destacaram na produção dos fatores de virulência avaliados. *B. cereus*, embora não isolado no presente trabalho, foi escolhido por ser produtor de proteínas deteriorantes do leite, inclusive toxinas, e também por ser morfológicamente diferente dos demais microrganismos, facilitando sua diferenciação em microscopia.

A partir das curvas de crescimento em TSB realizadas para os isolados de *E. coli* (B30), *S. aureus* (B12) e *B. cereus* ATCC 33018 (Figura 6), observou-se que ambas tinham tempos de geração (G) e velocidades de crescimento ( $\mu$ ) similares: *E. coli* (G = 36,12 min;  $\mu$  = 0,5 log/h), *S. aureus* (G = 36,12 min;  $\mu$  = 0,5 log/h) e *B. cereus* (G = 30, 10 min;  $\mu$  = 0,6 log/h). As fases lag de *E. coli* e *B. cereus* tiveram duração de 1h, enquanto que a de *S. aureus* foi de 2h.

As curvas de crescimento em leite integral UHT na temperatura de 35 °C são mostradas na Figura 7. Observa-se que as três espécies de microrganismos ingressam na fase log em até duas horas de incubação, de maneira similar ao ocorrido nas curvas de crescimento em TSB. Além disso, ao final das 6 horas o número de UFC/ mL se equipara ao resultado obtido com o caldo TSB. Isso reforça a hipótese de que o leite é um alimento rico e com disponibilidade de nutrientes, favorecendo o crescimento dos microrganismos e a formação de biofilmes devido ao aumento da população microbiana.

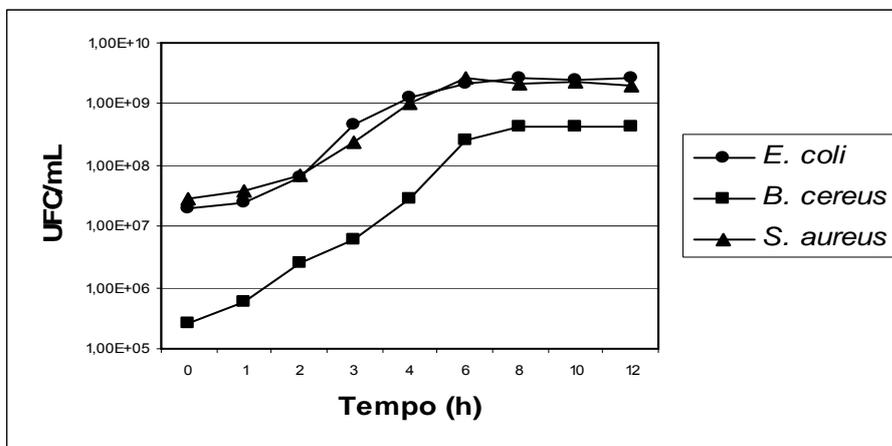


FIGURA 6: Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em TSB a 35 °C com agitação de 100 rpm e acompanhamento de 12h. (Porto Alegre, 2005).

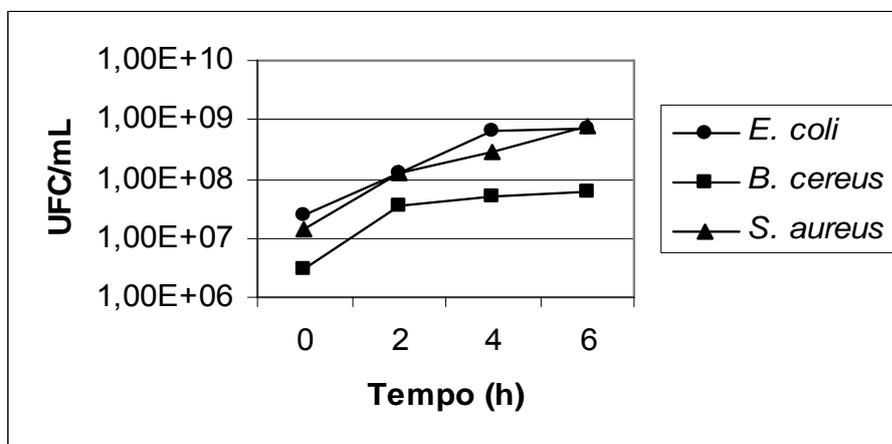


FIGURA 7: Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em leite integral UHT a 35 °C com agitação de 100 rpm e acompanhamento de 6h. (Porto Alegre, 2005).

O resultado das curvas de crescimento em leite integral UHT, nas temperaturas de 10 °C e 25 °C é apresentado nas Figuras 8 e 9. Após 8 horas de incubação nenhuma das três culturas atingiu a fase estacionária de crescimento.

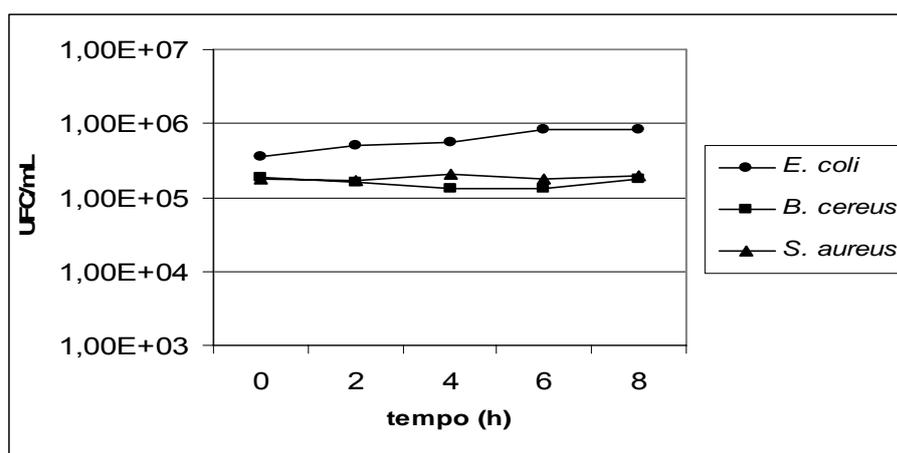


FIGURA 8: Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em leite integral UHT a 10 °C, sem agitação e acompanhamento de 8h. (Porto Alegre, 2005).

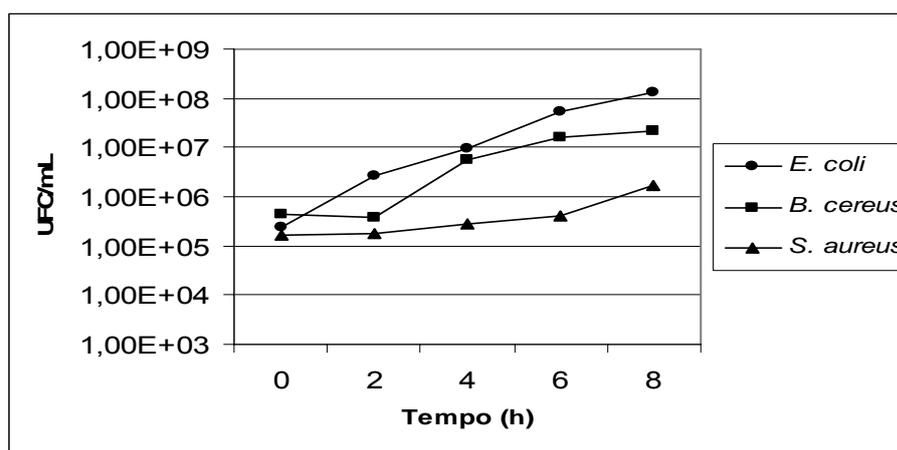


FIGURA 9: Curvas de crescimento de *Escherichia coli* (B30), *Bacillus cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus aureus* (B12) em leite integral UHT a 25 °C, sem agitação, e acompanhamento de 8h. (Porto Alegre, 2005).

#### 4.6.2 Teste de aderência dos consórcios bacterianos

O resultado do teste de aderência dos consórcios bacterianos é apresentado nas Figuras 10 a 18. As Figuras 10 a 12 referem-se à adesão de *E. coli* aos diferentes materiais; as Figuras 13 a 15 referem-se à adesão de *S. aureus* e as Figuras 16 a 18, *B. cereus* (Apêndice 4).

As três espécies bacterianas testadas aderiram melhor na temperatura de 25 °C e após 8 horas de contato, sendo polipropileno o material que permitiu maior adesão nas condições do experimento, também para os três microrganismos. A interação entre os 4 fatores analisados - consórcio bacteriano, material, temperatura e tempo de contato - foi estatisticamente significativa ( $\alpha=0,05$ ).

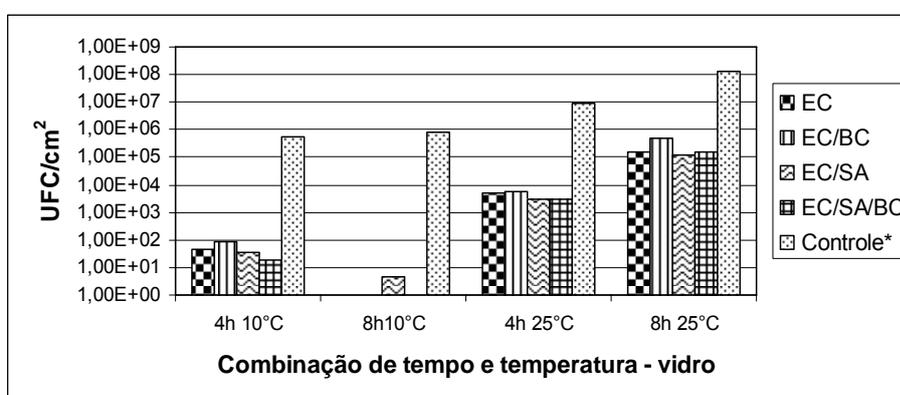


FIGURA 10: Adesão de *E. coli* (EC) ao vidro, em cultura pura ou em combinação com *B. cereus* (BC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *E. coli* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

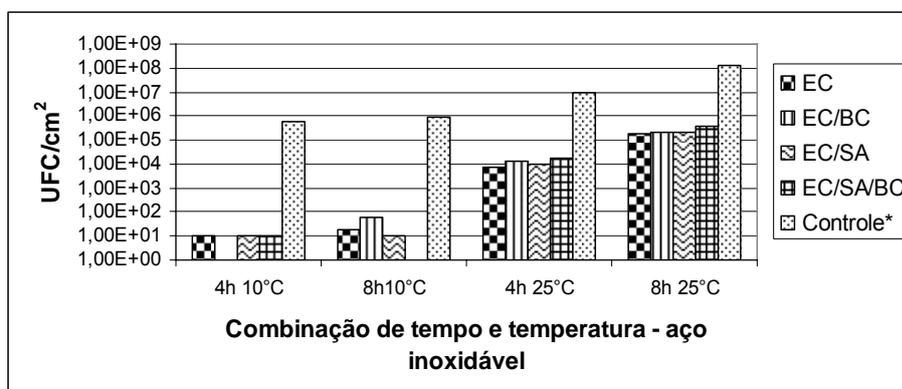


FIGURA 11: Adesão de *E. coli* (EC) ao aço inoxidável, em cultura pura ou em combinação com *B. cereus* (BC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *E. coli* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

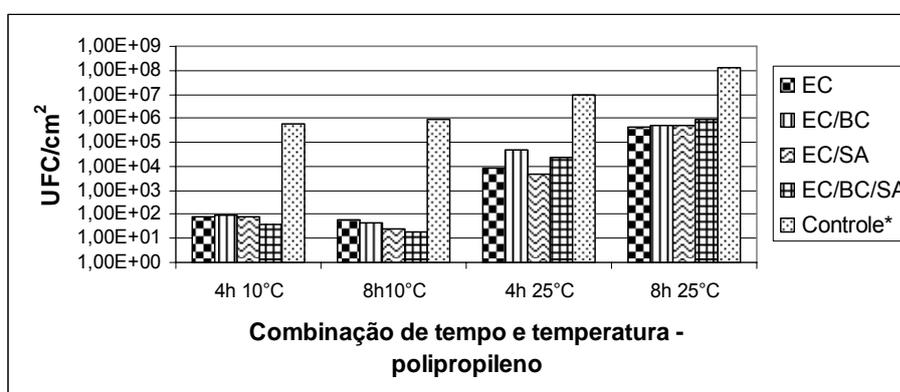


FIGURA 12: Adesão de *E. coli* (EC) ao polipropileno, em cultura pura ou em combinação com *B. cereus* (BC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *E. coli* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

*E. coli* foi o microrganismo que melhor aderiu em todos os materiais testados, tendo contagens similares para todos os materiais na temperatura de 25

°C, confirmando a superioridade dos Gram-negativos na colonização de superfícies (Leung et al., 1998), embora Barnes et al. (1999) tenham encontrado maior aderência dos Gram-positivos ao aço inoxidável.

A análise de variância demonstrou que a adesão de *E. coli* na associação de EC/BC no polipropileno em 4h 25 °C foi superior e estatisticamente diferente das contagens do microrganismo obtidas para os outros materiais nas mesmas condições de tempo e temperatura ( $\alpha=0,05$ ). No polipropileno 8h 25 °C a associação EC/BC/SA teve resultado igualmente significativo. Ainda com relação ao polipropileno, as contagens do microrganismo na condição 8h 25 °C foram superiores e estatisticamente diferentes da condição 8h 10 °C em todas as combinações bacterianas testadas, sendo que mesmo resultado não se repetiu na comparação entre a adesão em polipropileno 4h10 °C e 4h25 °C.

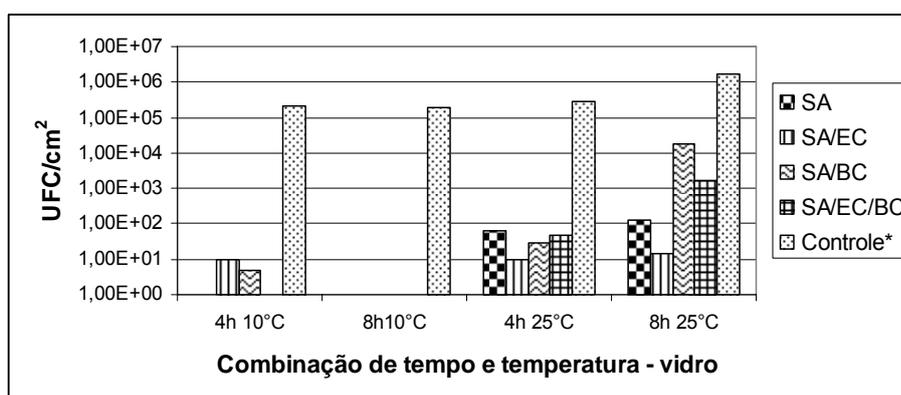


FIGURA 13: Adesão de *S. aureus* (SA) ao vidro, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *B. cereus* (BC), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *S. aureus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

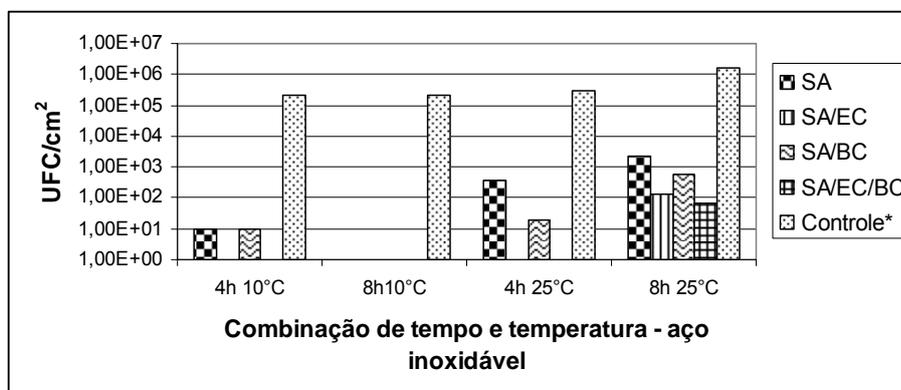


FIGURA 14: Adesão de *S. aureus* (SA) ao aço inoxidável, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *B. cereus* (BC), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *S. aureus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

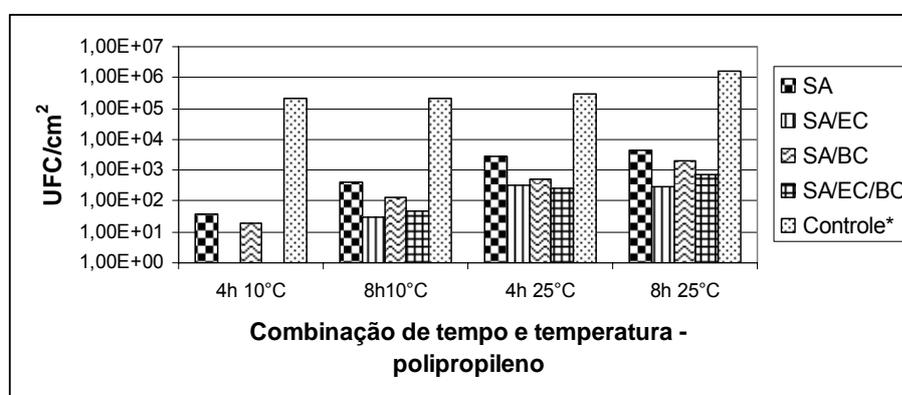


FIGURA 15: Adesão de *S. aureus* (SA) ao polipropileno, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *B. cereus* (BC), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *S. aureus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

A adesão de *S. aureus* ao vidro na combinação SA/BC 8h 25 °C se diferenciou estatisticamente ( $\alpha=0,05$ ) de todas as outras combinações, inclusive em relação os outros materiais, indicando que *B. cereus* favoreceu sua adesão. No polipropileno e no aço inoxidável, a adesão de *S. aureus* foi maior em cultura pura, embora a combinação SA/BC tenha aparecido como a segunda maior favorecedora. Tais resultados podem ter relação com a forma de *B. cereus* metabolizar o leite: por ser um microrganismo sabidamente produtor de variada gama de enzimas e, portanto, deteriorante – foi o que mais alterou visualmente o leite – pode ter favorecido a formação de um filme condicionante de diferente natureza, que acabou propiciando a adesão de *S. aureus*.

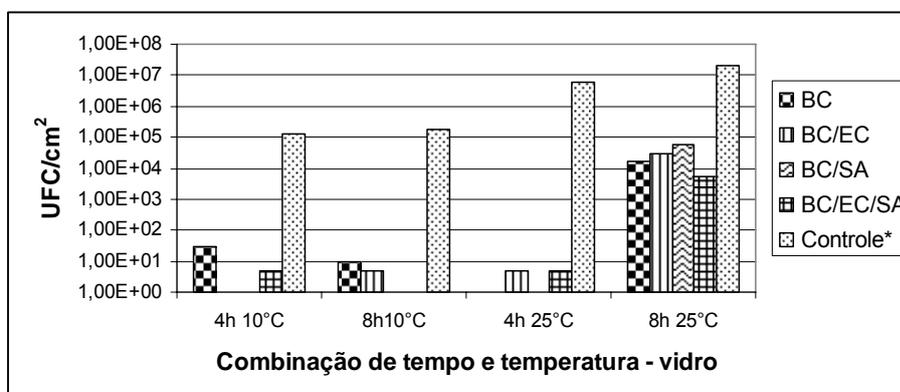


FIGURA 16: Adesão de *B. cereus* (BC) ao vidro, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *B. cereus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

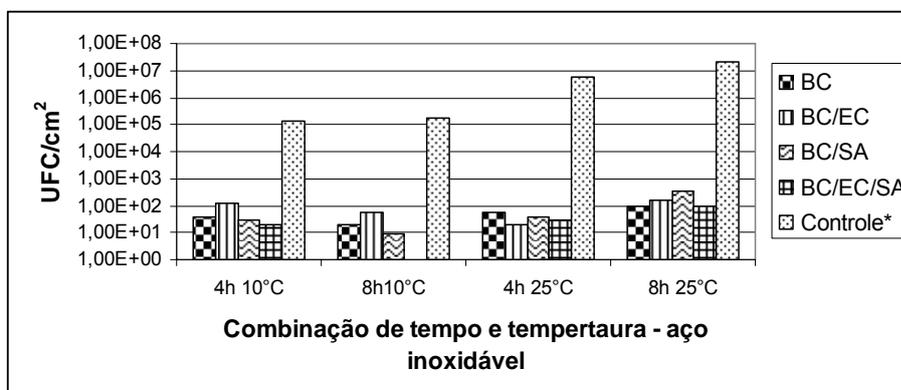


FIGURA 17: Adesão de *B. cereus* (BC) ao aço inoxidável, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *B. cereus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

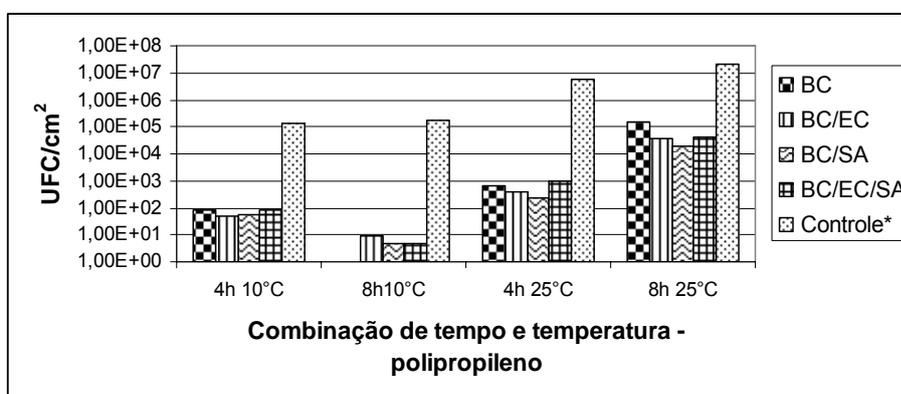


FIGURA 18: Adesão de *B. cereus* (BC) ao polipropileno, em cultura pura ou em combinação com *E. coli* (EC) e *S. aureus* (SA), variando-se as condições ambientais tempo e temperatura. \* O controle representa a contagem de *B. cereus* crescida no leite UHT em cada condição de tempo e temperatura, sendo apresentado em UFC/mL. (Porto Alegre, 2005).

A adesão de *B. cereus*, de maneira geral, foi maior em cultura pura e na combinação com *E. coli*, principalmente na temperatura de 10 °C. A análise de variância demonstrou que a contagem de *B. cereus* em cultura pura, na condição polipropileno 8h 25 °C se diferenciou das demais ( $\alpha=0,05$ ), sendo esta combinação a maior favorecedora de sua adesão. As outras combinações não apresentaram diferenças significativas entre si ( $\alpha=0,05$ ).

É interessante observar que, em geral, a adesão na temperatura de 10 °C, principalmente no vidro e no aço inoxidável não teve aumento diretamente proporcional ao tempo de contato. Pelo contrário, houve uma diminuição do número de células aderidas de 4h 10 °C para 8h 10 °C. O número de células de *B. cereus* aderidas em 10 °C apresentou redução em todos os materiais testados, e em quase todos os consórcios bacterianos testados, com exceção do vidro, onde foi detectado apenas no tempo 8h de contato, no consórcio BC/EC.

Para *E. coli*, a situação foi um pouco diferente: houve pequeno aumento no número de células no aço inoxidável de 4h 10 °C para 8h 10 °C, o que não ocorreu nos demais materiais. O resultado da adesão de *E. coli* ao polipropileno, em 10 °C é corroborado por Pompermayer & Gaylarde (2000).

Embora *S. aureus* tenha sido o microrganismo com menor aderência na temperatura de 10 °C - praticamente não sendo detectado no vidro e no aço inoxidável nessa condição - no polipropileno, apresentou adesão diretamente proporcional ao tempo e à temperatura analisados, indicando que o material favorece mais sua adesão. Tal resultado não foi encontrado por Pompermayer & Gaylarde (2000) na temperatura de 12 °C, onde houve pequena redução no

número de células do microrganismo aderidas de 4 horas para 8 horas de incubação.

Embora Pompermayer & Gaylarde (2000) tenham encontrado que na temperatura de 12 °C a adesão do microrganismo foi superior à de 30 °C, resultado não encontrado neste trabalho, é importante ressaltar que o polipropileno, no presente trabalho, foi o único material testado a permitir níveis de adesão similares entre as condições 8h 10° e 4h/8h 25 °C para *S. aureus*, concordando mais uma vez com afirmação desses autores, de que “não basta processar alimentos em baixas temperaturas se a qualidade microbiológica do alimento cru não for satisfatória”.

Através das contagens bacterianas obtidas, pode-se afirmar que na condição 4h 10 °C ainda está ocorrendo o processo inicial da formação de biofilmes, numa interação direta entre célula e superfície. Assim, a menor adesão em relação ao tempo, em 10 °C, talvez possa ser explicada pela hidrofobicidade dos materiais e das células bacterianas. *S. aureus* aglutinou em sulfato de amônio 2M, tendo uma hidrofobicidade intermediária, e aderiu melhor ao polipropileno, material com hidrofobicidade também intermediária. *E. coli* e *B. cereus*, por aglutinarem em 0,5M, tiveram elevada hidrofobicidade e foram capazes de manter ou elevar seu número de células aderidas somente no aço inoxidável, que teve também a maior hidrofobicidade superficial.

No tempo de 4h 10 °C é possível que se tenha detectado a interação hidrofóbica célula/superfície, que não se manteve ao longo do tempo devido à baixa temperatura. Esta forçou os microrganismos a diminuírem seu metabolismo

- inclusive *B. cereus* - e, possivelmente, impediu o aumento da força de adesão célula/superfície, fazendo os microrganismos serem removidos com a lavagem de solução PBS. Esse impedimento causado pela temperatura, poderia ser em nível de adsorção de substâncias ao material, viscosidade do meio de cultura e fisiologia dos microrganismos (Fletcher, 1977).

A motilidade de *E. coli* e *B.cereus* também pode servir de argumento para explicar sua maior aderência inicial (4h) na temperatura de 10 °C: segundo Fletcher (1977) e Stanley (1983), o flagelo bacteriano poderia auxiliar no contato com a superfície por se sobrepor à repulsão eletrostática com sua energia cinética. Vatanyoopaisarn et al. (2000) verificaram que a presença de flagelo em *Listeria monocytogenes* favoreceu sua adesão nas primeiras 3 horas de incubação, em comparação com a linhagem mutante para produção de flagelo. Porém, após maiores períodos de incubação, ambas apresentaram taxas similares de cobertura de superfície, indicando que diferentes fatores podem se intercalar no favorecimento da adesão ao longo do tempo.

Sinde & Carballo (2000) não obtiveram correlação entre hidrofobicidade e energia livre dos materiais, com número de células aderidas, mas verificaram que *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* aderiram melhor em materiais hidrofóbicos. Peng et al. (2001), ao estudarem a hidrofobicidade de *B. cereus* ao longo de suas fases de crescimento e compararem com sua adesão ao aço inox, constataram que a hidrofobicidade é o fator que mais afeta a adesão desse microrganismo ao material, em solução PBS. Isso pode servir para explicar sua maior adesão inicial em compostos hidrofóbicos como aço inoxidável e

polipropileno, no presente trabalho. O fato de *B. cereus* ter aderido significativamente no vidro em 8h 25 °C mostra que a hidrofobicidade celular é importante, mas não essencial a ponto de ser o único fator determinante de adesão ao substrato.

Poucas vezes o consórcio das 3 espécies bacterianas foi o que mais favoreceu a adesão, e ainda em níveis não estatisticamente significativos ( $\alpha=0,05$ ). Resultado similar foi encontrado por Norwood & Gilmour (2001), que estudaram a adesão de 2 cepas de *L. monocytogenes* em cultura pura, ou em consórcio com *Pseudomonas fragi* e *Staphylococcus xylosus*, onde maiores taxas de adesão foram encontrados em cultura pura do que nos consórcios. Como possíveis razões apontadas pelos autores estão a existência de competição por adesão e nutrientes (já mencionada por McEldowney & Fletcher, apud Pompermayer & Gaylarde, 2000, p.363) e a interferência negativa da composição dos EPS de *Staphylococcus sciuri*, apresentada por Leriche & Carpentier (2000).

Embora resultados de trabalhos similares tenham sido obtidos através de contagem em microscopia (Banks & Bryers, 1991; Pompermayer & Gaylarde, 2000), optou-se pela técnica de contagem em placa em detrimento da contagem em microscopia de epifluorescência devido ao esperado baixo número de células aderidas nos materiais, principalmente na temperatura de 10 °C. Parizzi et al. (2004), avaliaram a sensibilidade dos métodos de contagem em placa e microscopia de epifluorescência na determinação do número de células aderidas em diferentes materiais. Em seus resultados, constataram que contagens bacterianas através da microscopia de epifluorescência são mais confiáveis do

que a contagem em placa somente quando o número de células por campo for entre 10 e 100, refletindo-se em contagens de  $10^4$  a  $10^5$  células por  $\text{cm}^2$ .

#### **4.7 Visualização dos microrganismos aderidos**

##### **4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A observação dos corpos de prova submetidos ou não aos ensaios de adesão permitiu aprofundar os conhecimentos em relação à superfície dos materiais testados (Figura 19), além de acompanhar a formação dos filmes condicionantes e a adesão dos microrganismos propriamente dita ao longo do tempo.

O pano de algodão e o polipropileno possuem superfícies mais irregulares, provocadas pelo arranjo e composição das fibras (pano) ou por sua natureza polimérica (polipropileno). O aço inoxidável apresenta diversas deformidades, não percebidas macroscopicamente, mas capazes de permitir a adesão de alguns microrganismos. O vidro tem a superfície mais homogênea de todos os materiais.

Segundo Hood & Zottola (1995) a textura microscópica do material pode ter um papel muito importante na adesão dos microrganismos, uma vez que a interação microrganismo-substrato se dá nesse nível. Além disso, a presença de micro fendas pode abrigar e proteger microrganismos dos tratamentos sanitizantes (Stone & Zottola, 1985b).

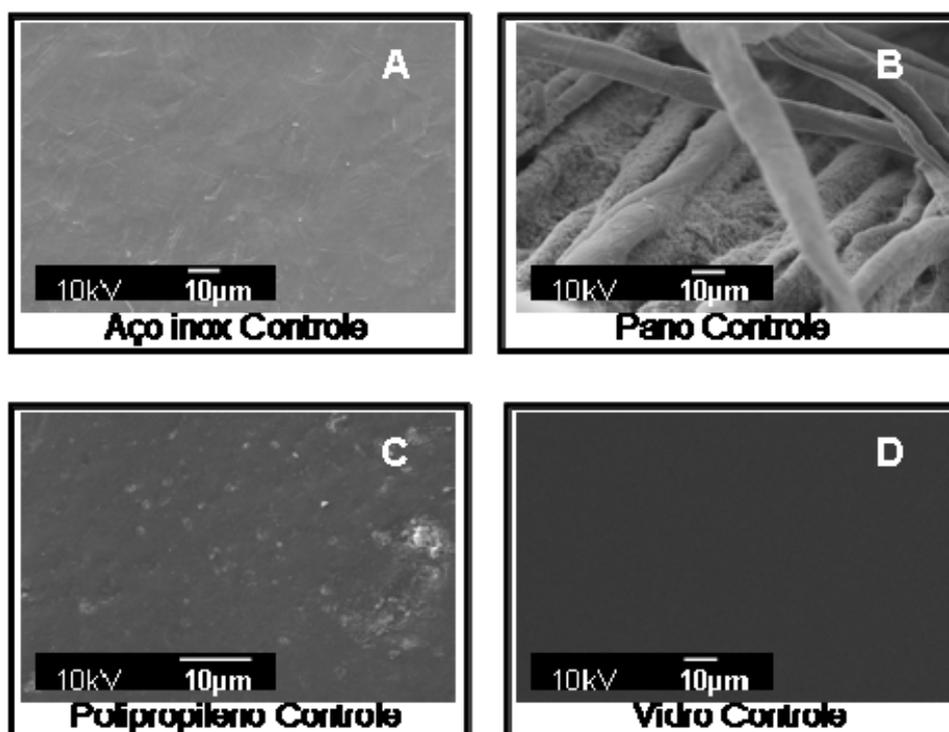


FIGURA 19: Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL<sup>®</sup>) dos materiais não submetidos ao ensaio de adesão. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 1000x; B = 1000x; C = 2000x; D = 1100x. (Porto Alegre, 2005).

Nas Figuras 20 a 23, observa-se que os filmes condicionantes se expandem na superfície ao longo do tempo, alterando, assim, as propriedades físico-químicas dos materiais. No tempo de 2 horas de contato, observa-se a presença de filme condicionante em todos os materiais e células aderidas em aço inoxidável. Percebe-se a capacidade do pano de algodão em reter partículas grandes e microrganismos entre as fibras. Estes podem tanto aderir diretamente na estrutura porosa do material, quanto nas substâncias por ele retidas.

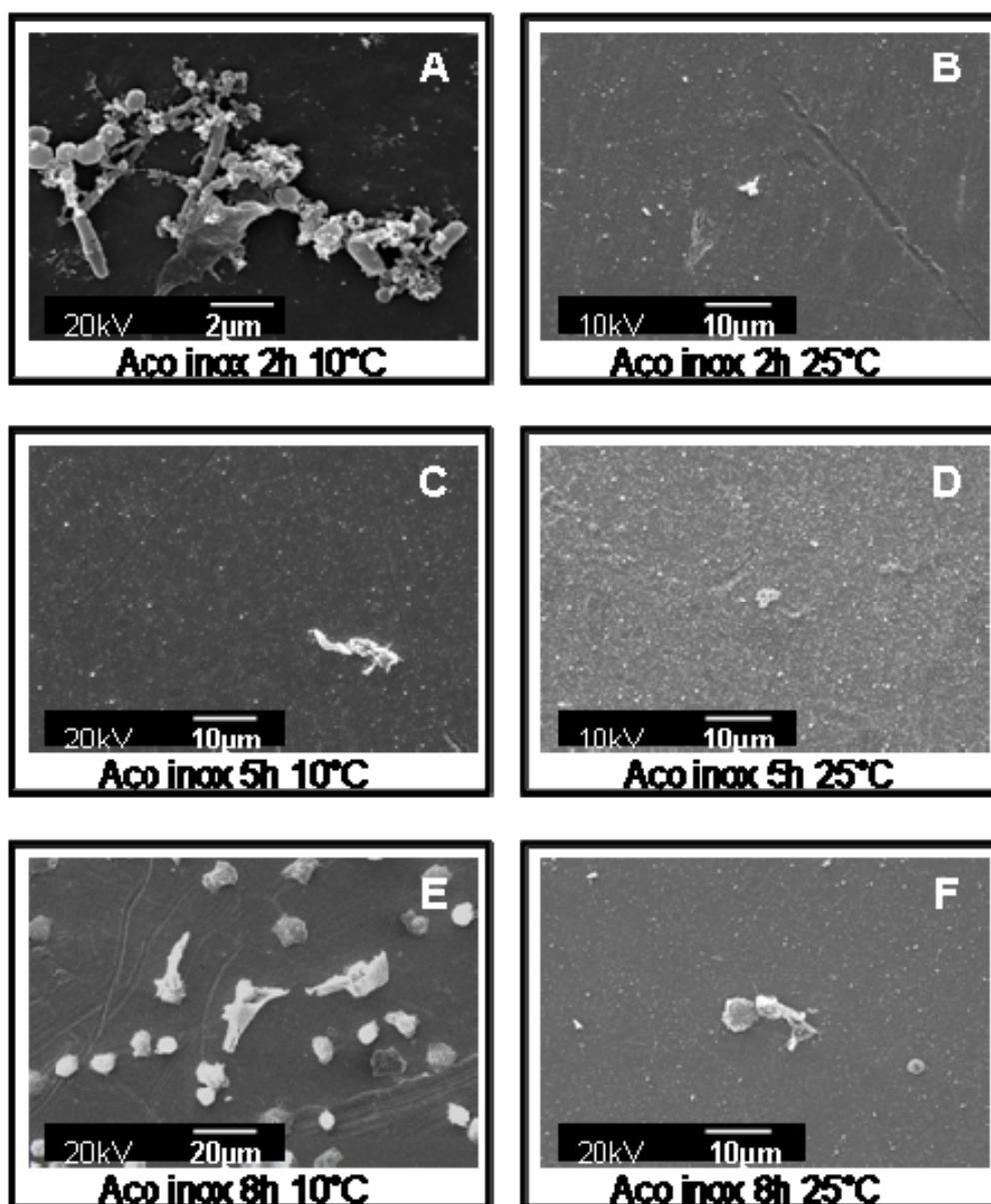


FIGURA 20: Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL<sup>®</sup>) do aço inoxidável, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 9500x; B = 2000x; C = 2000x; D = 2000x; E = 850x; F = 2200x. (Porto Alegre, 2005).

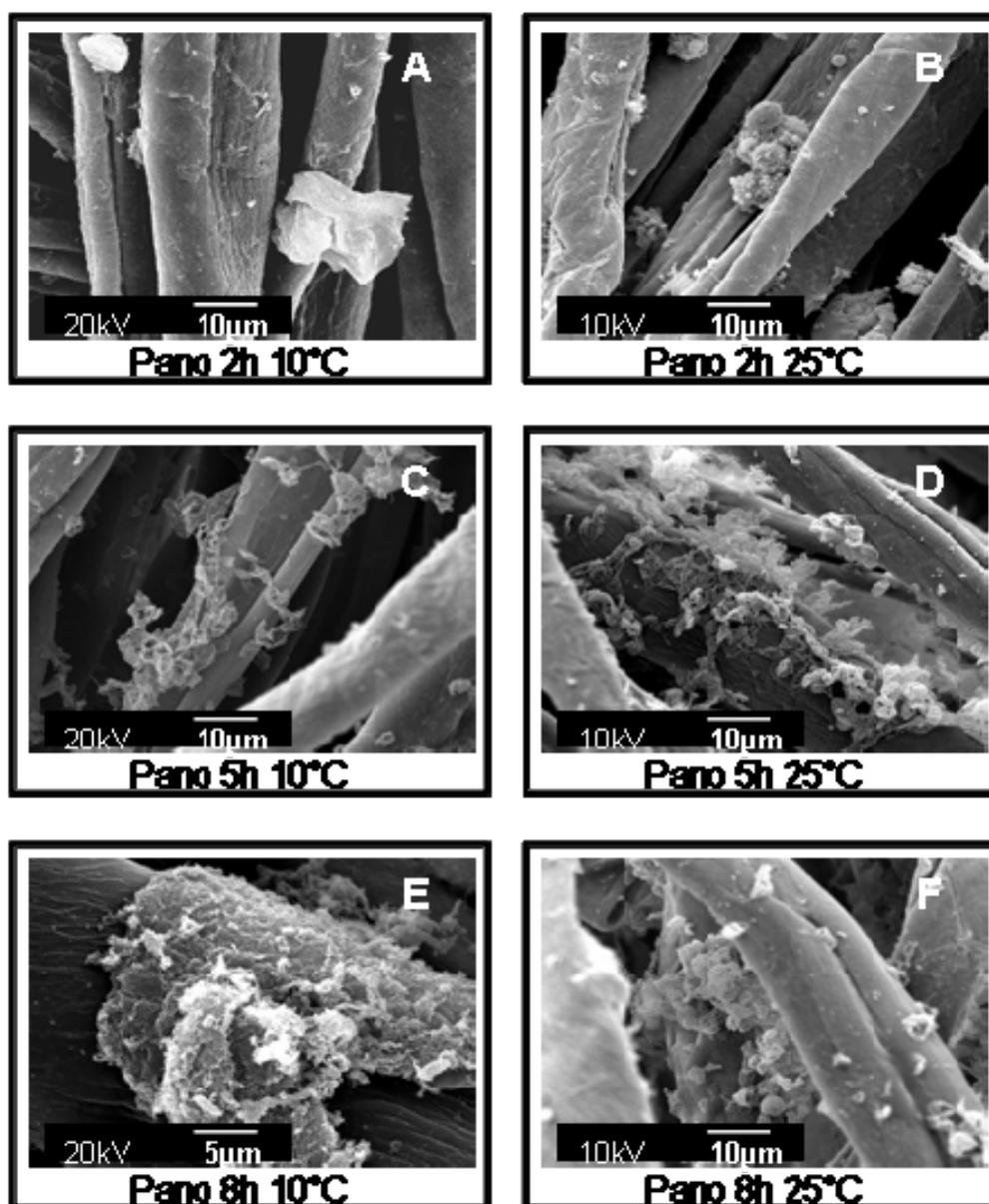


FIGURA 21: Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) do pano de algodão, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 2000x; B = 1800x; C = 2000x; D = 2000x; E = 4300x; F = 2000x. (Porto Alegre, 2005).

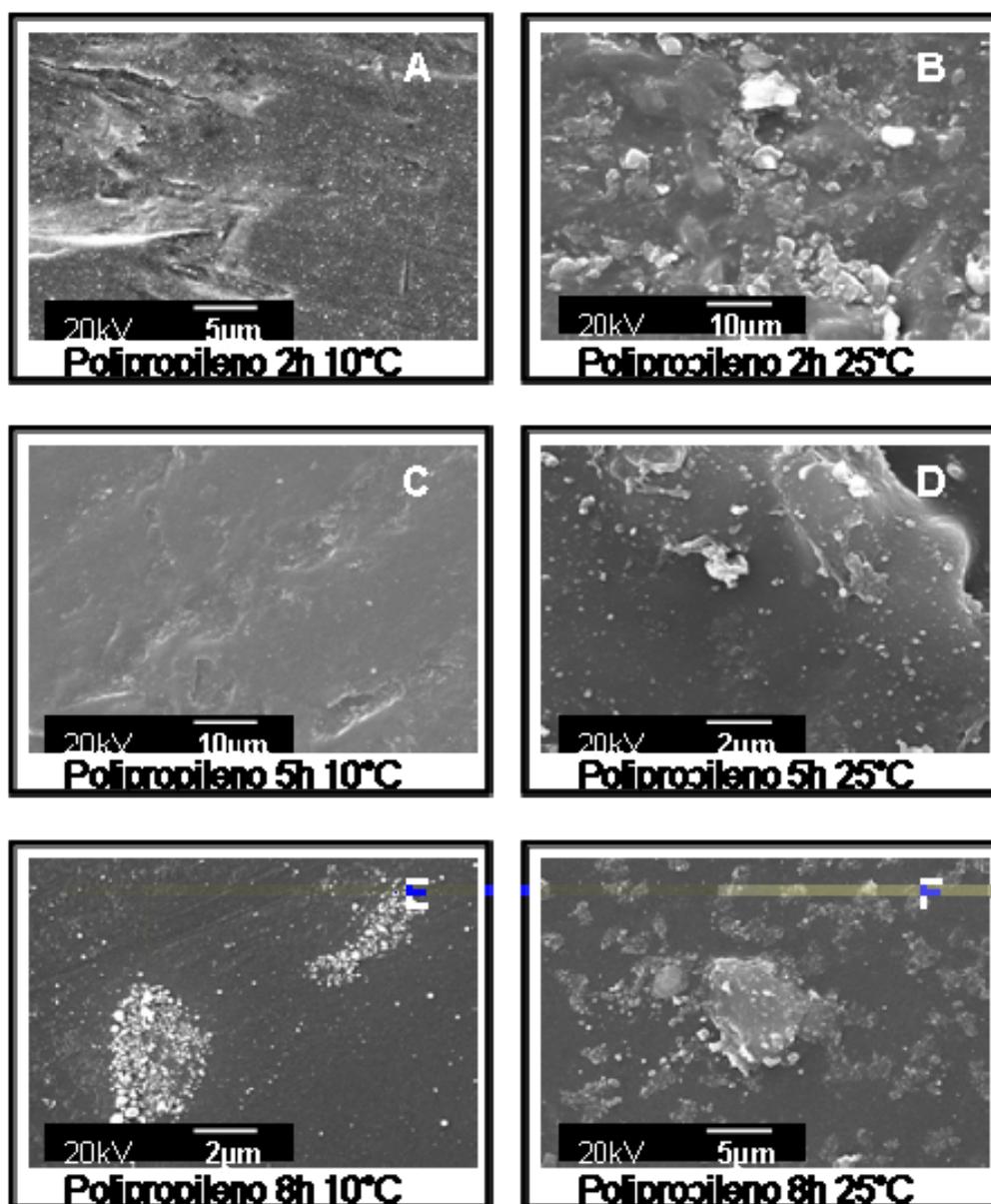


FIGURA 22: Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) do polipropileno, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 3000x; B = 2300x; C = 2000x; D = 8500x; E = 8500x; F = 3700x. (Porto Alegre, 2005).

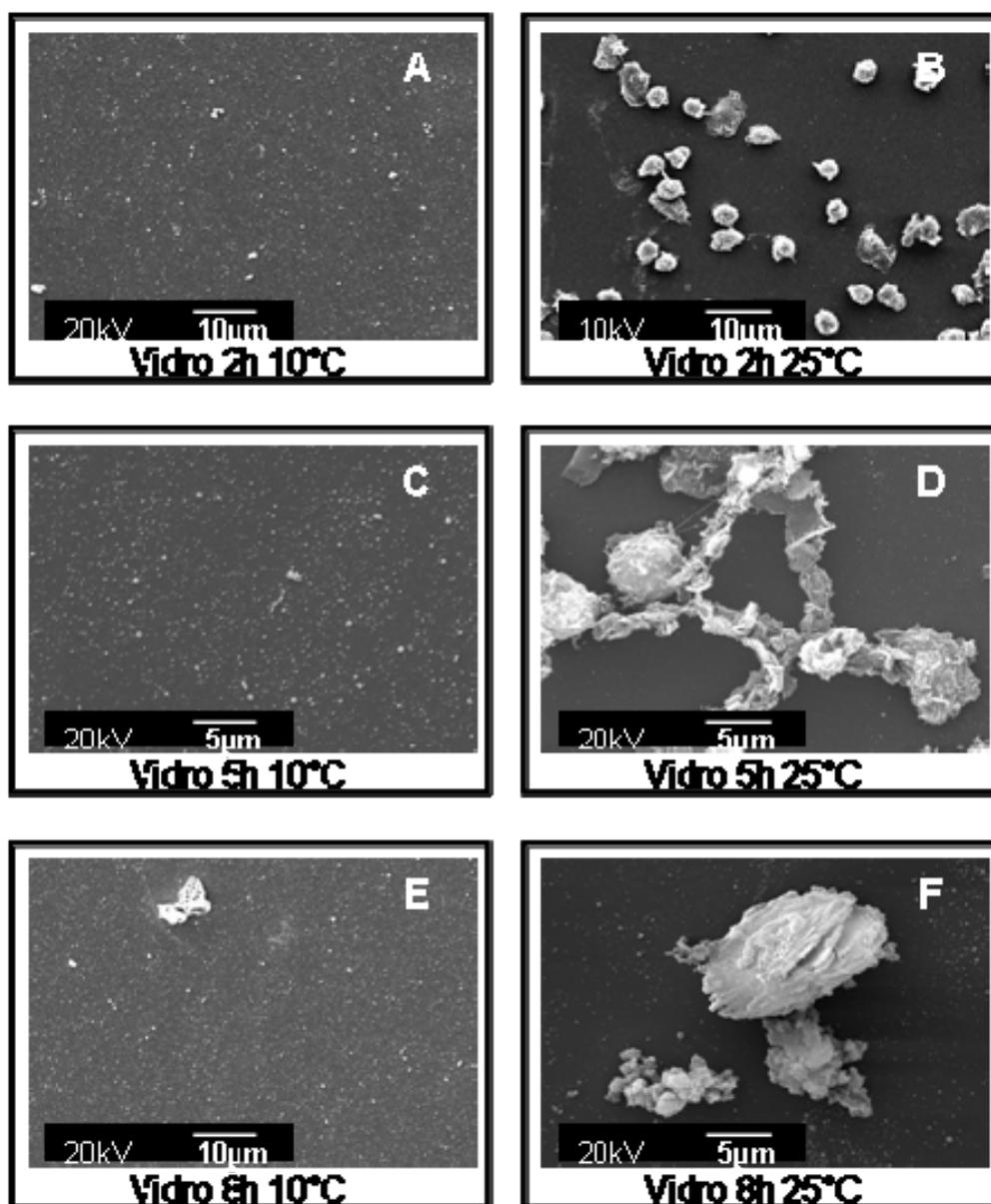


FIGURA 23: Imagens em microscopia eletrônica de varredura (JSM 5800 – JEOL®) do vidro, após ensaio de adesão bacteriana ao material, variando-se tempo de contato e temperatura. Imagens obtidas após fixação das amostras com glutaraldeído, desidratação com acetona e metalização com ouro. A = 2000x; B = 1000x; C = 3700x; D = 3000x; E = 2000x; F = 3700x. (Porto Alegre, 2005).

No material vidro, visualizou-se inicialmente a adesão de células eucarióticas na temperatura de 25 °C. À medida que o tempo foi passando, observou-se o surgimento de estruturas que ligam uma célula à outra, biofilmes no início de seu desenvolvimento. Esse padrão de formação de biofilmes foi observado também para o aço inoxidável, embora células eucarióticas só tenham sido observadas no tempo de 8h e em 10 °C.

O pequeno número de células bacterianas visualizado nos materiais e, inclusive, não condizente com as contagens em placa, pode ser resultado de uma série de fatores: a força de adesão das células aos materiais após esse relativamente curto espaço de tempo (de 2h a 8h), pode ter sido grande o suficiente para que estas resistissem à lavagem com PBS, mas não a ponto de tolerar as etapas do processamento das amostras para microscopia de varredura, quando os corpos de prova passaram por várias lavagens e foram, inevitavelmente, agitados nas soluções fixadora, de acetona e durante o transporte até o Centro de Microscopia Eletrônica. O protocolo de preparação das amostras utilizado também pode ter afetado negativamente a visualização dos microrganismos.

O processo de desidratação requerido pela MEV é, inclusive, um dos inconvenientes de sua utilização para visualização de biofilmes, estruturas muito hidratadas. Devido a isso, em alguns casos, é possível que se tenha reduções expressivas no volume de alguns componentes hidratados da matriz de EPS e rachaduras provocadas pela desidratação, resultando em artefatos (Fischer et al., apud Surman et al., 1996, p.65).

Talvez, a microscopia de força atômica, por não necessitar de preparação das amostras, teria sido uma opção melhor para as condições deste trabalho, embora também possua diversas limitações, como custo e dificuldade de interpretação das imagens. Porém, a microscopia de varredura permite a observação inicial da superfície em pequeno aumento, facilitando e agilizando o processo de análise, atributo que a microscopia de força atômica não possui (Beech et al., 2002). Devido ao fato de o biofilme não ser uma estrutura uniforme sobre a superfície, seria interessante levar em consideração essa peculiaridade na escolha do método microscópico de análise, dependendo dos objetivos do estudo.

O fato de terem sido observadas células bacterianas no vidro, em 25 °C talvez esteja relacionado à presença de células eucarióticas, provenientes do leite *in natura*, e que poderiam ter favorecido ligações célula/substrato fortes o suficiente para tolerar a preparação das amostras.

#### **4.7.2 Microscopia de epifluorescência**

A microscopia de epifluorescência (Figuras 24 a 26) foi utilizada para visualizar os consórcios bacterianos aderidos aos materiais, no intuito de ilustrar as combinações microrganismo/tempo/temperatura/material que se diferenciaram estatisticamente das demais. A adesão dos microrganismos em cultura pura também foi observada e utilizou-se como controle negativo de fluorescência os materiais não submetidos ao ensaio de adesão.



FIGURA 24: Imagens em microscopia de epifluorescência dos corpos de prova não submetidos ao ensaio de adesão (controle). As imagens foram obtidas em aumento de 1000x utilizando laranja de acridina como corante. (Porto Alegre, 2005).

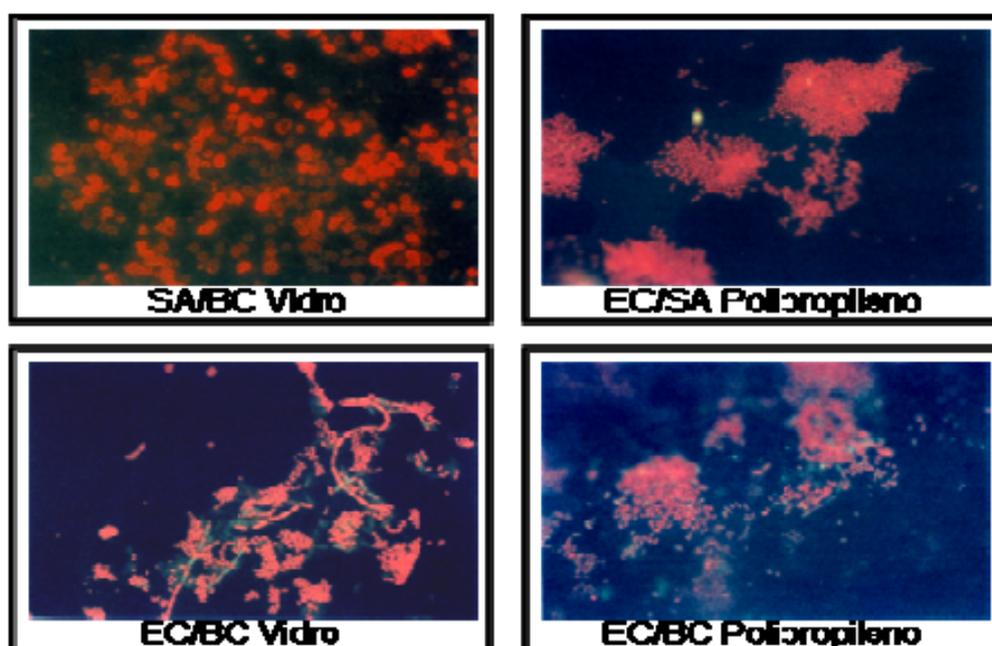


FIGURA 25: Imagens em microscopia de epifluorescência dos microrganismos aderidos em consórcios com 2 espécies bacterianas, após 8h de contato na temperatura de 25 °C, em diferentes materiais. As imagens foram obtidas em aumento de 1000x utilizando laranja de acridina como corante. EC = *E. coli*; SA = *S. aureus*; BC = *B. cereus*. (Porto Alegre, 2005).

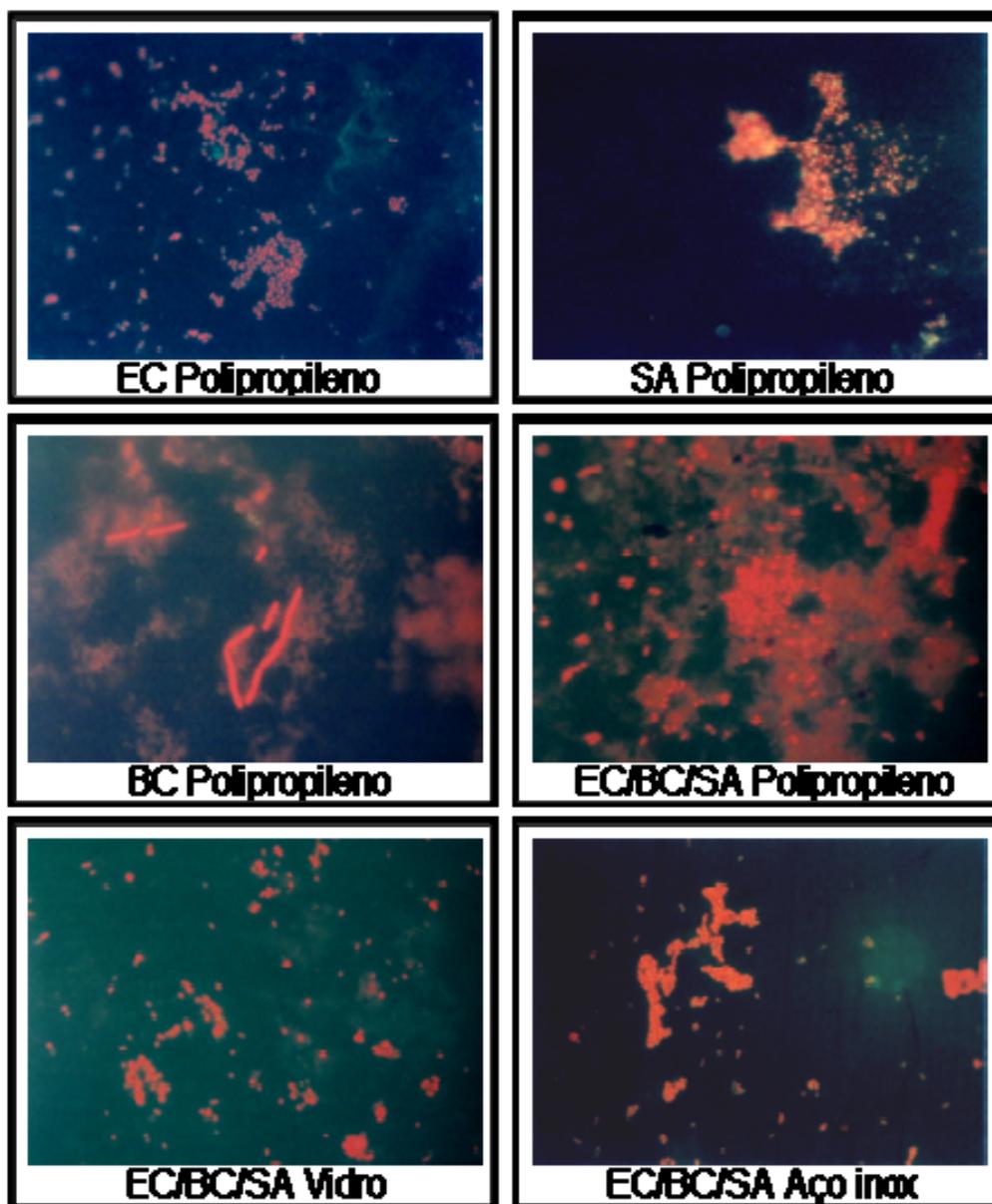


FIGURA 26: Imagens em microscopia de epifluorescência dos microrganismos aderidos em cultura pura e em consórcios com as 3 espécies bacterianas, após 8h de contato na temperatura de 25 °C. As imagens foram obtidas em aumento de 1000x utilizando laranja de acridina como corante. EC = *E. coli*; SA = *S. aureus*; BC = *B. cereus*. (Porto Alegre, 2005).

## 5. CONCLUSÕES

1. O pano de algodão foi o material que mais favoreceu a adesão de microrganismos do leite *in natura*, seguido por polipropileno, vidro e aço inoxidável, respectivamente.

2. O número de microrganismos aderidos foi diretamente proporcional ao tempo de contato com os corpos de prova e à elevação da temperatura de 10 °C para 25 °C, tanto para o teste de adesão utilizando leite *in natura* quanto no teste de adesão dos consórcios bacterianos de *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*.

3. Houve produção dos fatores de adesão cápsula e fímbria, em cerca de 50% dos isolados bacterianos provenientes do leite *in natura* e aderidos aos materiais.

4. No teste dos consórcios bacterianos, de maneira geral, os microrganismos aderiram melhor quando em cultura pura. A associação com *B. cereus* foi a que mais favoreceu a adesão de *E. coli* e *S. aureus*.

## 6. REFERÊNCIAS

ALLIGNET, J. et al. Tracking adhesion factors in *Staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material. **Microbiology**, Reading, v.145, p.2033–2042, 1999.

ALLIGNET, J. et al. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. **Infection and immunity**, Washington, v.69, supl. 2, p.712-718, 2001.

BANKS, M.K.; BRYERS, J.D. Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.7, p.1974-1979, 1991.

BARNES, L.M. et al. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.10, p.4543-4548, 1999.

BASELGA, R.; ALBIZU, I.; AMORENA, B. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.39, p.195-204, 1994.

BEECH, I.B. et al. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.23, p.231–247, 2002.

BENTO, F.M. Biocorrosão do aço ASTM 283-93C em sistemas diesel-água e o efeito de um biocida. 2001. 192 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e dos Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BOULANGE-PETERMANN, L. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, Chur, v.10, p.275-300, 1996.

BOWER, C.K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.71, p.152-157, 1996.

BUDI, S.W. et al. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. Strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.15, p.191-199, 2000.

CERCA, N. et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Research in Microbiology**, Paris, v.156, p.506-514, 2005.

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

COSTERTON, J.W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.49, p.711-745, 1995.

CRIADO, M.T.; SUÁREZ, B.; FERREIRÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. **Food Technology**, Chicago, v.48, p.123-126, 1994.

DA SILVA, Z.N. et al. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.35, n.4, p.375-379, 2001.

DIAS, A.M.G. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from blood and cerebrospinal fluid. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.25, n.2, p.77-82, 1994.

DI MARTINO, P. et al. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in Microbiology**, Paris, v.154, p.9-16, 2003.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, n.1, p.16-34, 2000.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L.A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.6, p. 2950-2958, 2002.

EIFF, C.V.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v.2, p.677-685, 2002.

EMÖDY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, v.22, p.29–33, 2003.

FINLAY, W.J.J.; LOGAN, N.A.; SUTHERLAND, A.D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. **Food Microbiology**, London, v.19, p.423–430, 2002.

FINUCANE, M.; SPRING, P.; NEWMAN, K. Incidence of mannose sensitive adhesins in enteric bacteria. **Poultry Science**, Champaign, v.78, suppl. 1, p.139, 1999.

FLETCHER, M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.23, n.1, p.1-6, 1977.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

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

GROSS, M.J.; LOGAN, B.E. Influence of different chemical treatments on transport of *Alcaligenes paradoxus* in porous media. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1750–1756, 1995.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.13, p.228–233, 2002.

HASSAN, A.N.; FRANK, J.F.; SHALABI, S.I. Factors affecting capsule size and production by lactic acid bacteria used as dairy starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.64, p.199–203, 2001.

HASSAN, A.N.; FRANK, J.F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.96, p.103–109, 2004.

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

IZQUIERDO, F.P.C.; HERNÁNDEZ, J.M. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). **Research in Microbiology**, Paris, v.153, p.181-185, 2002.

JACKSON, D. et al. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global carbon regulator *CsrA* of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.184, p.290–301, 2002.

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

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K.. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.42, p.9–27, 1998.

LARSEN, H.D.; JORGENSEN, K. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, p.173–176, 1999.

LEMONS, W.P.C.; GERMANI, J.C.; RECH, S.B. **Manual de Laboratório de Tecnologia Bioquímica**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1996. 225p.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.594-605, 2000.

LEUNG, J.W. et al. Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents?. **Gastrointestinal Endoscopy**, Denver, v.48, n.3, p.250-257, 1998.

LJUNGH, A.; HJERTEN, S.; WADSTROM, T. High surface hydrophobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. **Infection and Immunity**, Washington, v.47, supl. 2, p.522-526, 1985.

LOCATELLI, C.I. **Estudo da aderência bacteriana a lentes intraoculares de polimetilmetacrilato e de silicone**. 2001. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

LUDENSKY, M. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. **International Biodeterioration Biodegradation**, Barking, v.51, p.255-263, 2003.

LUDWICKA, A. et al. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, Stuttgart, v. 256, n.4, p.479-489, 1984.

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

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

MILES, A.A.; MIRSA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.

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

MORETRO, T. et al. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among Staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.9, p.5648–5655, 2003.

MORRA, M.; CASINELLI, C. *Staphylococcus* adhesion to film deposited from hydroxyethylmethacrylate plasma. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v.31, n.2, p.149-155, 1996.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.33, p.320-324, 2001.

OTTO, K.; ELWING, H.; HERMANSSON, M. Effect of ionic strength on the initial interactions of *Escherichia coli* with surfaces studied on-line by a novel quartz crystal microbalance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, p.5210-5218, 1999a.

OTTO, K.; ELWING, H.; HERMANSSON, M. The role of type-1 fimbriae in adhesion of *Escherichia coli* to hydrophilic and hydrophobic surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.15, p.99-111, 1999b.

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

PAUL, J.H.; JEFFREY, W.H. Evidence for Separate Adhesion Mechanisms for Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces in *Vibrio proteolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, n.2, p.431-437, 1985.

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**, Amsterdam, v.65, p.105–111, 2001.

PETERSON, R.V.; PITT, W.G. The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.17, p.219–227, 2000.

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**, London, v.17, p.361-365, 2000.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v.32, suppl. 6, p.321-326, 1999.

QADRI, F. et al. Congo red binding and salt aggregation test as indicators of virulence in *Shigella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.7, p.1343-1348, 1988.

ROSSONI, E.M.M. **Efeito de sanitizantes utilizados em indústrias de alimentos sobre bactérias aderidas a superfície de aço inoxidável**. 1997. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

SCHMIDT, H. et al. Effect of surface modifications of intraocular lenses on the adherence of *Staphylococcus epidermidis*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Stuttgart, v.287, n.1-2, p.135-145, 1998.

SEELEY J.R.; VANDEMARK. P.J.; LEE, J.J. **Microbes in action**: a laboratory manual of microbiology. New York: H. W. Freeman and Company, 1991. 450p. Cap.4 : Staining bacteria.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, London, v.17, p.439-447, 2000.

SOMMER, P.; MARTIN-ROUAS, C.; METTLER, E. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. **Food Microbiology**, London, v.16, p.503-515, 1999.

SOTO, G.E.; HULTGREN, S.J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, p.1059–1071, 1999.

STANLEY, P.M. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.1493-1499, 1983.

STICKLER, D. Biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.2, p.270-275, 1999.

STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and its attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.957-960, 1985a.

STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopy study of stainless steel finishes used in food processing equipment. **Food Technology**, Chicago, v.39, n.5, p.110-114, 1985b.

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

SUÁREZ, B.; FERREIRÓS, C.M.; CRIADO, M.T. Adherence of psychrotrophic bacteria to dairy equipment surfaces. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.59, p.381-388, 1992.

SURMAN, S.B. et al. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.25, p. 57-70, 1996.

TEIXEIRA, P. et al. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, London, v.22, p.247–251, 2005.

TRUSZCZYNSKY, M.; OSEK, J. Occurrence of mannose resistant hemagglutinins in *Escherichia coli* strains isolated from porcine colibacillosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infections Diseases**, Oxford, v.10, p.117-124, 1987.

VANDENESCH, F. et al. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates isolated as human pathogens and from goat milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p.888–892, 1995.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.92, p.179–185, 2003.

VATANYOOPAISARN, S. et al. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.2, p.860-863, 2000.

WEBB, J.S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.6, p.578-585, 2003.

WHITCHURCH, C.B. et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, Washington, v.295, p.1487, 2002.

WONG, A.C.L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.2765–2770, 1998.

YOKOYA, F. **Higiene e Sanitização de Fábrica de Alimentos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1977. 117p.

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

## **7. APÊNDICES**

**APÊNDICE 1 - Meios de cultura e soluções utilizadas****Ágar CFA**

Casaminoácido	10 g
Extrato de levedura	1,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,05 g
MnCl <sub>2</sub>	0,005 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 mL

Aquecer até dissolver o ágar. Ajustar pH 7,4 e esterilizar em autoclave a 121 °C por 20 min.

**Ágar Sal Manitol (Merck)**

Extrato de carne	1,0 g
Peptona	10 g
NaCl	75 g
D-manitol	10 g
Vermelho de Fenol	0,025 g
Agar	12 g
Água destilada	1000 mL

Aquecer até dissolver o ágar. Ajustar pH 7,4 ± 0,1 e esterilizar em autoclave a 121 °C por 15 min.

**Ágar Cereus (Merck)**

Extrato de carne	1,0 g
Peptona	10 g
D-manitol	10 g
NaCl	10 g
Vermelho de Fenol	0,025 g
Agar	12 g
Água destilada	900 mL

Ajustar pH 7,0 – 7,2 e esterilizar a 121 °C por 15 min. Quando na temperatura de 50 °C, adicionar 100 mL de emulsão de gema de ovo estéril e verter em placa.

**Ágar EMB (Merck)**

Peptona-caseína	10 g
Lactose	5 g
Sacarose	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Eosina	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Ágar	13,5 g
Água destilada	1000 mL

Ajustar pH 7,0–7,2 e esterilizar em autoclave a 121 °C por 15 min.

**Ágar Baird-Parker (Oxoid)**

Triptona	10 g
Extrato de carne	5 g
Extrato de levedura	1 g
Piruvato de sódio	10 g
Glicina	12 g
Cloreto de lítio	5 g
Ágar	20 g
Água destilada	950 mL

Ajustar pH  $6,8 \pm 0,2$  e esterilizar em autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Quando na temperatura de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , adicionar 50 mL de emulsão de gema de ovo estéril com telurito de potássio e verter em placa.

**Ágar Leite**

Leite em pó desnatado	100 g
Extrato de levedura	1,5 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL

Autoclavar separadamente o leite dissolvido em água e os demais ingredientes, também dissolvidos, por 10 min a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Solução PBS 1x**

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Água	100 mL

Aquecer para dissolver os componentes. Ajustar pH 7,4 e autoclavar a 121° por 15 minutos.

**Reagentes para coloração de cápsula****Solução de Vermelho Congo**

Vermelho congo	0,5 g
Água	100 mL

**Solução de Maneval**

Fucsina	0,05 g
Cloreto férrico (FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O)	3,0 g
Ácido acético glacial	5 mL
Fenol liquefeito	3,9 mL
Água	95 mL

**Solução de Laranja de Acridina (epifluorescência)****Tampão Fosfato:****Solução A**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	9,78 g
Água destilada	1000 mL

**Solução B**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	11,87 g
Água destilada	1000 mL

Para a solução final de pH 7,5, deve-se utilizar 12,8 mL de solução A e 87,2 mL da solução B.

**Soluções utilizadas na preparação das amostras para MEV****1 - Solução Fixadora**

Glutaraldeído 25%	1,2 mL
Tampão Fosfato 0,2M	5 mL
Água destilada	3,8M

**2 - Tampão Fosfato 0,2M****Solução A:**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (P.M. 137,9)	2,75 g
Água destilada	100 mL

**Solução B:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (P.M. 268,07)	26,80 g
Água destilada	500 mL

Adicionar a solução B na A, aos poucos, até o pH ficar entre 7,2 – 7,4.

**APÊNDICE 2 – Distribuição dos fatores de virulência por isolado bacteriano. Pa=pano de algodão;  
Po=polipropileno; A=Aço inoxidável; V=vidro; Hidrof.= hidrofobicidade celular;  
NA=não aglutinante; AA=auto-aglutinante.**

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Protease</b>	<b>Cápsula</b>	<b>Hemolisinas</b>	<b>Fímbria</b>	<b>Fímbria1</b>	<b>Hidrof.</b>
<b>E1</b>	<i>Serratia plymuthica</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	-	-	2,0M
<b>E2</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	-	-	1,0M
<b>E3</b>	<i>Enterobacter hormaechae</i>	Pa 25° 8h	-	-	-	+	-	2,5M
<b>E4</b>	<i>Serratia plymuthica</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,5M
<b>E5</b>	<i>Serratia plymuthica</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	-	-	2,5M
<b>E6</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	-	-	+	-	1,5M
<b>E7</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	2,5M
<b>E8</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	2,0M
<b>E9</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	+	0,5M
<b>E10</b>	<i>Serratia plymuthica</i>	Pa 25° 8h	-	-	-	-	-	2,0M
<b>E11</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,5M
<b>E12</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	NA
<b>E13</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	0,5M
<b>E14</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,0M
<b>E15</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	0,5M
<b>E16</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,5M
<b>E17</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	2,0M
<b>E18</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,5M
<b>E19</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,5M
<b>E20</b>	<i>Serratia plymuthica</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,5M
<b>E21</b>	<i>Serratia fonticola</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	-	-	NA
<b>E22</b>	<i>Enterobacter hormaechae</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,5M
<b>E23</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	+	-	1,0M
<b>E24</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	-	-	0,5M
<b>E25</b>	<i>Escherichia coli</i>	Pa 25° 8h	-	-	-	+	-	0,5M
<b>E26</b>	<i>Escherichia coli</i>	A 25° 8h	-	+	-	+	-	0,5M
<b>E27</b>	<i>Escherichia coli</i>	A 25° 8h	-	+	-	+	-	0,5M
<b>E28</b>	<i>Escherichia coli</i>	A 25° 8h	-	+	-	+	-	0,5M
<b>E29</b>	<i>Escherichia coli</i>	A 25° 8h	-	+	-	+	+	0,5M

## Continuação - APÊNDICE 2

Isolado	Espécie	Origem	Protease	Cápsula	Hemolisinas	Fímbria	Fímbria1	Hidrof.
E30	<i>Escherichia coli</i>	A 25° 8h	-	-	-	+	+	0,5M
S1	<i>S. intermedius</i>	Po 25° 8h	-	-	+	+	-	2,0M
S2	<i>S. caprae</i>	Po 25° 8h	-	-	+	+	-	2,0M
S3	<i>S. intermedius</i>	Po 25° 8h	-	-	+	+	-	1,0M
S4	<i>S. intermedius</i>	Po 25° 8h	-	-	+	+	-	1,5M
S5	<i>S. aureus</i>	Po 25° 8h	-	-	+	+	-	1,5M
S6	<i>S. intermedius</i>	Po 25° 8h	-	-	+	+	-	1,5M
S7	<i>S. intermedius</i>	Po 25° 8h	-	-	+	-	-	1,0M
S8	<i>S. chromogenes</i>	Po 25° 8h	+	-	-	-	-	0,5M
S9	<i>S. aureus</i>	Pa 10° 8h	-	-	+	+	-	1,5M
S10	<i>S. chromogenes</i>	Pa 10° 8h	+	-	-	-	-	2,5M
S11	<i>S. intermedius</i>	A 25° 8h	-	-	+	-	-	1,5M
S12	<i>S. aureus</i>	A 25° 8h	-	-	+	+	-	1,5M
S13	<i>S. aureus</i>	A 25° 8h	-	-	+	-	-	1,5M
S14	<i>S. aureus</i>	V 25° 2h	-	-	+	+	-	1,5M
S15	<i>S. aureus</i>	Po 25° 2h	-	-	+	+	-	1,0M
S16	<i>S. intermedius</i>	V 25° 8h	-	-	+	-	-	1,5M
S17	<i>S. aureus</i>	A 25° 5h	-	-	+	+	-	1,5M
S18	<i>S. intermedius</i>	A 25° 5h	-	-	+	-	-	1,5M
S19	<i>S. chromogenes</i>	Po 25° 5h	+	-	-	-	-	1,5M
S20	<i>S. intermedius</i>	Po 25° 5h	-	-	+	-	-	1,5M
S21	<i>S. intermedius</i>	Po 25° 5h	-	-	+	-	-	1,5M
S22	<i>S. chromogenes</i>	Po 25° 5h	+	-	-	-	-	2,5M
S23	<i>S. aureus</i>	Pa 10° 2h	-	-	+	-	-	1,5M
S24	<i>S. intermedius</i>	Pa 10° 2h	-	-	+	-	-	1,5M
S25	<i>S. aureus</i>	Pa 10° 2h	-	-	+	-	-	AA
S26	<i>S. caprae</i>	Pa 25° 5h	-	-	+	-	-	1,0M
S27	<i>S. klosii</i>	Pa 25° 5h	-	-	-	-	-	3,0M
S28	<i>S. caprae</i>	Pa 25° 5h	-	-	+	-	-	1,5M
S29	<i>S. caprae</i>	Pa 25° 8h	-	-	+	-	-	1,0M
S30	<i>S. chromogenes</i>	Pa 25° 2h	+	-	-	-	-	0,5M
B1	<i>S. aureus</i>	V 25° 8h	-	-	+	-	-	1,0M
B2	<i>S. chromogenes</i>	Pa 25° 2h	+	-	+	-	-	NA
B3	<i>S. caprae</i>	Po 25° 5h	-	-	+	-	-	2,0M

## Continuação - APÊNDICE 2

Isolado	Espécie	Origem	Protease	Cápsula	Hemolisinas	Fímbria	Fímbria1	Hidrof.
B4	<i>S. lentus</i>	Po 25° 2h	-	-	+	-	-	0,5M
B5	<i>Comamonas</i> sp.	Pa 25° 8h	-	+	+	+	-	AA
B6	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pa 25° 8h	+	+	+	-	-	1,0M
B7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pa 25° 8h	+	+	+	-	-	2,0M
B8	<i>Enterobacter asburiae</i>	Pa 25° 8h	-	+	-	-	-	1,5M
B9	<i>Xanthomonas</i> sp.	Pa 25° 8h	-	+	-	+	+	AA
B10	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pa 25° 8h	+	+	+	+	-	2,5M
B11	<i>S. warneri</i>	Pa 25° 5h	-	-	+	-	-	AA
B12	<i>S. aureus</i>	Pa 25° 5h	-	+	+	+	-	2,0M
B13	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pa 25° 5h	+	+	+	-	-	1,5M
B14	<i>S. klosii</i>	A 25° 8h	-	+	+	-	-	1,0M
B15	<i>Pseudomonas</i> sp.	A 25° 8h	+	+	+	-	-	1,5M
B16	<i>Xanthomonas</i> sp.	Po 10° 8h	-	-	+	-	-	AA
B17	<i>Xanthomonas</i> sp.	V 10° 8h	+	-	+	-	-	0,5M
B18	<i>Hafnia alvei</i>	Pa 10° 2h	-	-	-	-	-	AA
B19	<i>S. lentus</i>	A 25° 2h	-	+	-	-	-	NA
B20	<i>S. aureus</i>	A 10° 5h	-	-	+	-	-	1,5M
B21	<i>Kluyvera</i> sp.	Po 25° 8h	-	+	+	-	-	1,0M
B22	<i>S. sciuri</i>	Po 25° 8h	+	-	-	-	-	AA
B23	<i>S. aureus</i>	Po 10° 5h	-	-	+	+	-	1,0M
B24	<i>S. chromogenes</i>	A 25° 5h	+	-	+	+	-	0,5M
B25	<i>S. caprae</i>	Pa 10° 8h	-	-	+	+	-	1,5M
B26	<i>Hafnia alvei</i>	Pa 10° 8h	-	-	-	-	-	AA
B27	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pa 10° 8h	-	+	+	+	-	1,5M
B28	<i>Xanthomonas</i> sp.	Pa 10° 8h	+	-	-	-	-	0,5M
B29	<i>S. chromogenes</i>	A 25° 8h	-	-	-	-	-	AA
B30	<i>Escherichia coli</i>	A 25° 8h	-	+	+	+	-	0,5M
B31	<i>S. warneri</i>	Pa 25° 8h	-	+	+	-	-	1,5M
B32	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pa 25° 8h	+	+	+	+	-	1,5M
B33	<i>Enterobacter asburiae</i>	Pa 25° 5h	-	+	+	+	-	1,5M
B34	<i>Kluyvera</i> sp.	Pa 25° 5h	-	+	+	-	-	1,0M
B35	<i>Pseudomonas</i> sp.	Po 25° 8h	-	+	+	-	-	AA
B36	<i>Enterobacter cloacae</i>	Po 25° 8h	-	+	+	+	+	1,5M

### Continuação - APÊNDICE 2

Isolado	Espécie	Origem	Protease	Cápsula	Hemolisinas	Fímbria	Fímbria1	Hidrof.
<b>B37</b>	<i>Xanthomonas</i> sp.	Po 10° 8h	+	+	+	-	-	0,5M
<b>B38</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Po 10° 8h	+	+	-	+	-	2,0M
<b>B39</b>	<i>Hafnia alvei</i>	Pa 10° 8h	-	+	-	-	-	AA
<b>B40</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pa 10° 8h	+	+	+	-	-	1,5M
<b>B41</b>	<i>Enterobacter asburiae</i>	Pa 25° 8h	-	+	+	+	-	2,0M
<b>B42</b>	<i>Cedecea</i> sp.	Pa 25° 8h	+	+	+	+	-	2,0M
<b>B43</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pa 25° 8h	+	+	+	-	-	1,5M

**APÊNDICE 3 – Médias e desvios padrão das contagens de microrganismos aderidos aos materiais e contidos em leite *in natura*. Temp.=temperatura de incubação; média=média aritmética da contagem de cada uma das placas de PCA (valores em UFC/ mL).**

<b>pano de algodão 2h</b>												
<b>Temp.</b>	<b>Coleta 1</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 2</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 3</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>
10°	6200	3800	<b>5,0E+03</b>	1,70E+03	20000	35000	<b>2,8E+04</b>	1,06E+04	900	900	<b>9,0E+02</b>	0,00E+00
25°	10900	14700	<b>1,3E+04</b>	2,69E+03	233000	281000	<b>2,6E+05</b>	3,39E+04	13900	11000	<b>1,2E+04</b>	2,05E+03
<b>pano de algodão 5h</b>												
<b>Temp.</b>	<b>Coleta 1</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 2</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 3</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>
10°	3800	7200	<b>5,5E+03</b>	2,40E+03	45000	47000	<b>4,6E+04</b>	1,41E+03	1600	1400	<b>1,5E+03</b>	1,41E+02
25°	270000	370000	<b>3,2E+05</b>	7,07E+04	3710000	250000	<b>2,0E+06</b>	2,45E+06	57000	58000	<b>5,8E+04</b>	7,07E+02
<b>pano de algodão 8h</b>												
<b>Temp.</b>	<b>Coleta 1</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 2</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 3</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>
10°	15000	17700	<b>1,6E+04</b>	1,91E+03	118000	152000	<b>1,4E+05</b>	2,40E+04	5500	3500	<b>4,5E+03</b>	1,41E+03
25°	2750000	860000	<b>1,8E+06</b>	1,34E+06	13920000	16400000	<b>1,5E+07</b>	1,75E+06	580000	1460000	<b>1,0E+06</b>	6,22E+05
<b>vidro 2h</b>												
<b>Temp.</b>	<b>Coleta 1</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 2</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 3</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>
10°	0	0	<b>0,0E+00</b>	0,00E+00	180	80	<b>1,3E+02</b>	7,07E+01	10	40	<b>2,5E+01</b>	2,12E+01
25°	80	60	<b>7,0E+01</b>	1,41E+01	1800	3700	<b>2,8E+03</b>	1,34E+03	40	0	<b>2,0E+01</b>	2,83E+01
<b>vidro 5h</b>												
<b>Temp.</b>	<b>Coleta 1</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 2</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>	<b>Coleta 3</b>		<b>média</b>	<b>desvio</b>
10°	20	10	<b>1,5E+01</b>	7,07E+00	630	580	<b>605</b>	3,54E+01	60	0	<b>3,0E+01</b>	4,24E+01
25°	970	310	<b>6,4E+02</b>	4,67E+02	12500	12100	<b>12300</b>	2,83E+02	100	140	<b>1,2E+02</b>	2,83E+01

### Continuação - APÊNDICE 3

vidro 8h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	0	50	<b>2,5E+01</b>	3,54E+01	1140	670	<b>9,1E+02</b>	3,32E+02	30	40	<b>3,5E+01</b>	7,07E+00
25°	9300	10400	<b>9,9E+03</b>	7,78E+02	128000	160800	<b>1,4E+05</b>	2,32E+04	7300	8500	<b>7,9E+03</b>	8,49E+02

polipropileno 2h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	120	50	<b>8,5E+01</b>	4,95E+01	360	380	<b>3,7E+02</b>	1,41E+01	70	80	<b>7,5E+01</b>	7,07E+00
25°	80	240	<b>1,6E+02</b>	1,13E+02	12900	12200	<b>1,3E+04</b>	4,95E+02	110	50	<b>8,0E+01</b>	4,24E+01

polipropileno 5h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	30	30	<b>3,0E+01</b>	0,00E+00	510	560	<b>5,4E+02</b>	3,54E+01	100	150	<b>1,3E+02</b>	3,54E+01
25°	2370	2240	<b>2,3E+03</b>	9,19E+01	32000	37000	<b>3,5E+04</b>	3,54E+03	620	400	<b>5,1E+02</b>	1,56E+02

polipropileno 8h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	40	20	<b>3,0E+01</b>	1,41E+01	2400	2500	<b>2,5E+03</b>	7,07E+01	20	30	<b>2,5E+01</b>	7,07E+00
25°	14700	9000	<b>1,2E+04</b>	4,03E+03	1600000	600000	<b>1,1E+06</b>	7,07E+05	3000	2400	<b>2,7E+03</b>	4,24E+02

aço inoxidável 2h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	90	0	<b>4,5E+01</b>	6,36E+01	130	110	<b>1,2E+02</b>	1,41E+01	0	10	<b>5,0E+00</b>	7,07E+00
25°	370	110	<b>2,4E+02</b>	1,84E+02	1290	1190	<b>1,2E+03</b>	7,07E+01	50	40	<b>4,5E+01</b>	7,07E+00

aço inoxidável 5h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	130	20	<b>7,5E+01</b>	7,78E+01	460	540	<b>5,0E+02</b>	5,66E+01	10	0	<b>5,0E+00</b>	7,07E+00
25°	1350	300	<b>8,3E+02</b>	7,42E+02	15800	21200	<b>1,9E+04</b>	3,82E+03	40	30	<b>3,5E+01</b>	7,07E+00

### Continuação - APÊNDICE 3

aço inoxidável 8h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	1010	930	<b>9,7E+02</b>	5,66E+01	570	410	<b>4,9E+02</b>	1,13E+02	10	20	<b>1,5E+01</b>	7,07E+00
25°	2350	2860	<b>2,6E+03</b>	3,61E+02	37400	40800	<b>3,9E+04</b>	2,40E+03	350	320	<b>3,4E+02</b>	2,12E+01

controle 2h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	430000	320000	<b>3,8E+05</b>	7,78E+04	900000	3100000	<b>2,0E+06</b>	1,56E+06	110000	250000	<b>1,8E+05</b>	9,90E+04
25°	2700000	2600000	<b>2,7E+06</b>	7,07E+04	37500000	21200000	<b>2,9E+07</b>	1,15E+07	400000	650000	<b>5,3E+05</b>	1,77E+05

controle 5h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	2500000	900000	<b>1,7E+06</b>	1,13E+06	3100000	4100000	<b>3,6E+06</b>	7,07E+05	260000	250000	<b>2,6E+05</b>	7,07E+03
25°	120000000	35000000	<b>7,8E+07</b>	6,01E+07	251000000	172000000	<b>2,1E+08</b>	5,59E+07	8600000	3100000	<b>5,9E+06</b>	3,89E+06

controle 8h												
Temp.	Coleta 1		média	desvio	Coleta 2		média	desvio	Coleta 3		média	desvio
10°	3400000	3150000	<b>3,3E+06</b>	1,77E+05	6400000	17800000	<b>1,2E+07</b>	8,06E+06	160000	470000	<b>3,2E+05</b>	2,19E+05
25°	223000000	2,56E+08	<b>2,4E+08</b>	2,33E+07	928000000	1632000000	<b>1,3E+09</b>	4,98E+08	39000000	33000000	<b>3,6E+07</b>	4,24E+06

**APÊNDICE 4 - Médias e desvios padrão das contagens de consórcios de microrganismos aderidos aos materiais e contidos em leite UHT. Média = média aritmética das contagens após 3 repetições (valores em UFC/ cm<sup>2</sup>); EC=*E. coli*; SA=*S. aureus*; BC=*B. cereus*;**

<b>Adesão de EC nos consórcios</b>									
<b>Material</b>	<b>Consórcio</b>	<b>Média 4h</b>	<b>Desvio 4h</b>	<b>Média 8h</b>	<b>Desvio 8h</b>	<b>Média 4h</b>	<b>Desvio 4h</b>	<b>Média 8h</b>	<b>Desvio 8h</b>
		<b>10 °C</b>	<b>10 °C</b>	<b>10 °C</b>	<b>10 °C</b>	<b>25 °C</b>	<b>25 °C</b>	<b>25 °C</b>	<b>25 °C</b>
VIDRO	EC	<b>4,82E+01</b>	2,21E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>5,26E+03</b>	1,09E+03	<b>1,46E+05</b>	8,28E+04
VIDRO	EC/SA	<b>3,38E+01</b>	3,34E+01	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>3,17E+03</b>	2,05E+03	<b>1,25E+05</b>	3,88E+04
VIDRO	EC/BC	<b>8,20E+01</b>	6,84E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>5,37E+03</b>	2,68E+03	<b>5,12E+05</b>	3,33E+05
VIDRO	EC/SA/BC	<b>1,93E+01</b>	2,21E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>2,92E+03</b>	1,41E+03	<b>1,56E+05</b>	1,99E+04
AÇO	EC	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>1,93E+01</b>	1,67E+01	<b>7,37E+03</b>	6,80E+03	<b>1,79E+05</b>	1,10E+05
AÇO	EC/SA	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>1,02E+04</b>	5,37E+03	<b>2,04E+05</b>	1,19E+05
AÇO	EC/BC	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>5,79E+01</b>	5,79E+01	<b>1,39E+04</b>	2,94E+03	<b>2,19E+05</b>	1,08E+05
AÇO	EC/SA/BC	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>1,75E+04</b>	1,02E+03	<b>3,64E+05</b>	1,90E+05
POLIPRO	EC	<b>7,72E+01</b>	1,67E+01	<b>6,27E+01</b>	3,34E+01	<b>9,06E+03</b>	5,21E+03	<b>4,57E+05</b>	7,77E+04
POLIPRO	EC/SA	<b>7,72E+01</b>	3,34E+01	<b>2,41E+01</b>	3,01E+01	<b>5,05E+03</b>	3,81E+03	<b>4,89E+05</b>	9,36E+04
POLIPRO	EC/BC	<b>8,68E+01</b>	5,79E+01	<b>4,34E+01</b>	1,45E+01	<b>4,95E+04</b>	2,18E+04	<b>4,90E+05</b>	1,14E+05
POLIPRO	EC/SA/BC	<b>3,86E+01</b>	3,34E+01	<b>1,93E+01</b>	2,21E+01	<b>2,33E+04</b>	8,97E+03	<b>9,25E+05</b>	6,62E+05

**Adesão de SA nos consórcios**

### Continuação - APÊNDICE 4

Material	Consórcio	Média 4h	Desvio 4h	Média 8h	Desvio 8h	Média 4h	Desvio 4h	Média 8h	Desvio 8h
		10 °C	10 °C	10 °C	10 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C
VIDRO	SA	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>6,27E+01</b>	4,18E+01	<b>1,25E+02</b>	1,81E+02
VIDRO	EC/SA	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>9,65E+00</b>	8,35E+00	<b>1,45E+01</b>	1,45E+01
VIDRO	SA/BC	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>2,89E+01</b>	3,83E+01	<b>1,71E+04</b>	8,73E+03
VIDRO	EC/SA/BC	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>4,82E+01</b>	5,85E+01	<b>1,66E+03</b>	1,46E+03
AÇO	SA	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>0,00E+00</b>	1,67E+01	<b>3,67E+02</b>	4,61E+02	<b>2,23E+03</b>	2,19E+03
AÇO	EC/SA	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>1,25E+02</b>	2,17E+02
AÇO	SA/BC	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>1,93E+01</b>	1,67E+01	<b>5,50E+02</b>	4,78E+02
AÇO	EC/SA/BC	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>6,75E+01</b>	1,67E+01
POLIPRO	SA	<b>3,86E+01</b>	4,42E+01	<b>3,95E+02</b>	3,09E+02	<b>2,67E+03</b>	1,60E+03	<b>4,60E+03</b>	3,52E+03
POLIPRO	EC/SA	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>2,89E+01</b>	2,51E+01	<b>3,09E+02</b>	1,48E+02	<b>2,80E+02</b>	2,21E+02
POLIPRO	SA/BC	<b>1,93E+01</b>	3,34E+01	<b>1,25E+02</b>	6,52E+01	<b>5,21E+02</b>	2,09E+02	<b>2,02E+03</b>	1,29E+03
POLIPRO	EC/SA/BC	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>4,82E+01</b>	1,67E+01	<b>2,60E+02</b>	1,90E+02	<b>7,23E+02</b>	5,12E+02
<b>Adesão de BC nos consórcios</b>									
Material	Consórcio	Média 4h	Desvio 4h	Média 8h	Desvio 8h	Média 4h	Desvio 4h	Média 8h	Desvio 8h
		10 °C	10 °C	10 °C	10 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C
VIDRO	BC	<b>2,89E+01</b>	3,83E+01	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>1,76E+04</b>	6,84E+03
VIDRO	EC/BC	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>2,86E+04</b>	2,31E+04
VIDRO	SA/BC	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>6,01E+04</b>	5,33E+04

### Continuação - APÊNDICE 4

Material	Consórcio	Média 4h	Desvio 4h	Média 8h	Desvio 8h	Média 4h	Desvio 4h	Média 8h	Desvio 8h
		10 °C	10 °C	10 °C	10 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C
VIDRO	EC/SA/BC	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>5,16E+03</b>	4,07E+03
AÇO	<b>BC</b>	<b>3,86E+01</b>	1,67E+01	<b>1,93E+01</b>	3,34E+01	<b>5,79E+01</b>	5,01E+01	<b>9,65E+01</b>	1,02E+02
AÇO	EC/BC	<b>1,16E+02</b>	1,26E+02	<b>5,79E+01</b>	5,01E+01	<b>1,93E+01</b>	3,34E+01	<b>1,54E+02</b>	8,84E+01
AÇO	SA/BC	<b>2,89E+01</b>	2,89E+01	<b>9,65E+00</b>	1,67E+01	<b>3,86E+01</b>	6,68E+01	<b>3,38E+02</b>	3,12E+02
AÇO	EC/SA/BC	<b>1,93E+01</b>	3,34E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>2,89E+01</b>	2,89E+01	<b>9,65E+01</b>	8,84E+01
POLIPRO	<b>BC</b>	<b>7,72E+01</b>	1,67E+01	<b>0,00E+00</b>	0,00E+00	<b>6,37E+02</b>	7,88E+02	<b>1,46E+05</b>	1,04E+05
POLIPRO	EC/BC	<b>4,82E+01</b>	6,02E+01	<b>9,65E+00</b>	8,35E+00	<b>3,67E+02</b>	1,17E+02	<b>3,46E+04</b>	3,09E+04
POLIPRO	SA/BC	<b>5,79E+01</b>	0,00E+00	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>2,31E+02</b>	2,51E+02	<b>1,90E+04</b>	1,10E+04
POLIPRO	EC/SA/BC	<b>7,72E+01</b>	4,42E+01	<b>4,82E+00</b>	8,35E+00	<b>9,26E+02</b>	4,32E+02	<b>4,03E+04</b>	2,05E+04

**APÊNDICE 5 – Tabelas de resultados das análises estatísticas efetuadas em relação à produção de fatores de virulência e hidrofobicidade celular.**

Cápsula	Grupo				Total	
	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Staphylococcus</i>		n	%
	n	%	n	%		
Ausente	7	15.2	38	90.5	45	51.1
Presente	39	84.8	4	9.5	43	48.9
Total	46	100.0	42	100.0	88	100.0

$\chi^2=46,80$ ;  $p<0,001$ ;

Cápsula	Material						Total	
	Aço		Pano		Polipropileno		n	%
	n	%	n	%	n	%		
Ausente	9	52.9	20	33.9	18*	78.3	47	47.5
Presente	8	47.1	39*	66.1	5	21.7	52	52.5
Total	17	100.0	59	100.0	23	100.0	99	100.0

$\chi^2=13,31$ ;  $p=0,001$ ; \* Análise de Resíduos Ajustados:  $p<0,05$ ;

Fímbria	Grupo				Total	
	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Staphylococcus</i>		n	%
	n	%	n	%		
Ausente	14	30.4	28	66.7	42	47.7
Presente	32	69.6	14	33.3	46	52.3
Total	46	100.0	42	100.0	88	100.0

$\chi^2=10,15$ ;  $p=0,001$ ;

Fímbria	Material						Total	
	Aço		Pano		Polipropileno		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	8	47.1	29	49.2	13	56.5	50	50.5
Presente	9	52.9	30	50.8	10	43.5	49	49.5
Total	17	100.0	59	100.0	23	100.0	99	100.0

$\chi^2=0,46$ ;  $p=0,796$ ;

### HIDROFOBICIDADE CELULAR

Grupo	n	Hidrofobicidade		p
		Média	Desvio-padrão	
<i>Enterobacteriaceae</i>	44	1.26	0.72	0,802
<i>Staphylococcus</i>	40	1.30	0.69	

Material	n	Hidrofobicidade	
		Média	Desvio padrão
Aço	16	0.94	0.54
Pano	56	1.31	0.76
Polipropileno	23	1.20	0.70

<b>Causas de Variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Soma de quadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Material	2	1,77	1,73	0,183
Erro Experimental	92	47,09		
Total Corrigido	94	48,86		

**Obs.:** Foram desconsiderados os dados com NA (não aglutinantes) e, para todas as análises, foram desconsideradas as informações referentes ao vidro.

**APÊNDICE 6 - Tabelas de resultados das análises estatísticas efetuadas em relação às contagens em PCA de microrganismos aderidos aos materiais e contidos no leite *in natura*.**

**CONTAGENS EM PCA**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Material	3	0.00151542	0.00050514	40.25	<.0001
Temperatura	1	0.00000771	0.00000771	0.61	0.4371
Tempo	2	0.00002528	0.00001264	1.01	0.3728
Material*Temperatura	3	0.00002409	0.00000803	0.64	0.5930
Material*Tempo	6	0.00007172	0.00001195	0.95	0.4671
Temperatura*Tempo	2	0.00000658	0.00000329	0.26	0.7703
Materi*Tempera*Tempo	6	0.00001639	0.00000273	0.22	0.9693
Error	48	0.00060237	0.00001255		
Corrected Total	71	0.00226957			

Tukey Grouping	Mean	N	Material
A	0.010708	18	Pano de algodão
B	0.000204	18	Polipropileno
B	0.000073	18	Vidro
B	0.000065	18	Aço inox

**APÊNDICE 7 - Tabelas de resultados das análises estatísticas  
efetuadas em relação à adesão em consórcios  
bacterianos. Os resultados são mostrados em  
relação aos microrganismos isoladamente.**

**7.1 *Escherichia coli* (EC)**

<i>Fonte de variação</i>	<i>GL</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
Consórcio	3	19414087.7	6471362.6	5.21	0.0022
material	2	33381565.3	16690782.6	13.43	<.0001
temperatura	1	174671797.2	174671797.2	140.58	<.0001
Tempo	1	25245413.0	25245413.0	20.32	<.0001
Cons*mate	6	9794101.8	1632350.3	1.31	0.2585
Cons*temper	3	19891988.3	6630662.8	5.34	0.0019
Cons*tempo	3	10098275.2	3366091.7	2.71	0.0494
mate*temper	2	28883567.0	14441783.5	11.62	<.0001
mate*tempo	2	10215830.9	5107915.5	4.11	0.0194
temper*tempo	1	27933702.4	27933702.4	22.48	<.0001
Cons*mate*temper	6	10268108.0	1711351.3	1.38	0.2316
Cons*mate*tempo	6	29328173.4	4888028.9	3.93	0.0015
Cons*temper*tempo	3	10300845.5	3433615.2	2.76	0.0462
mate*temper*tempo	2	11856920.5	5928460.3	4.77	0.0106
<b>Cons*mate*temp*tempo</b>	<b>6</b>	<b>27981952.1</b>	<b>4663658.7</b>	<b>3.75</b>	<b>0.0021</b>
Erro	96	119280425.3	1242504.4		
Total	143	568546753.5			

**Comparação múltipla de médias através do método de Tukey. Aço = aço inoxidável; Polipro = polipropileno.**

		<i>4H</i>			<i>8H</i>		
		<b>AÇO</b>	<b>POLIPRO</b>	<b>VIDRO</b>	<b>AÇO</b>	<b>POLIPRO</b>	<b>VIDRO</b>
10 °C	EC	19,96 f	159,68 f	99,80 f	26,14 f	84,97 f	0,00 f
	EC/BC	0,00 f	179,64 f	0,00 f	78,43 f	58,82 f	0,00 f
	EC/SA	19,96 f	159,68 f	69,86 f	13,07 f	32,68 f	6,54 f
	EC/SA/BC	19,96 f	79,84 f	39,92 f	0,00 f	26,14 f	0,00 f
25 °C	EC	893,57 def	1098,24 cdef	637,43 def	1566,24 cdef	4000,00 bcde	1278,48 cdef
	EC/BC	1684,21 cdef	6000,00 ab	1684,21 def	1915,61 cdef	4286,92 bcd	4481,01 abc
	EC/SA	1239,77 cdef	612,87 def	384,21 ef	1784,81 cdef	4278,48 bcd	1097,05 cdef
	EC/SA/BC	2116,96 cdef	4,68 f	354,39 ef	3181,43 bcdef	8092,83 ab	1367,09 cdef

## 7.2 *Staphylococcus aureus* (SA)

<i>Fonte de variação</i>	<i>GL</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Consórcio	3	64698518.3	21566172.8	10.58	<.0001
material	2	39582986.1	19791493.0	9.71	0.0001
temperatura	1	71482867.0	71482867.0	35.06	<.0001
tempo	1	2159312.7	2159312.7	1.06	0.3060
Cons*mate	6	126050291.2	21008381.9	10.30	<.0001
Cons*temper	3	41663558.4	13887852.8	6.81	0.0003
Cons*tempo	3	41164846.4	13721615.5	6.73	0.0004
Mate*temper	2	18149930.6	9074965.3	4.45	0.0142
Mate*tempo	2	35441161.3	17720580.7	8.69	0.0003
Temper*tempo	1	533.0	533.0	0.00	0.9871
Cons*mate*temper	6	90579707.6	15096617.9	7.40	<.0001
Cons*mate*tempo	6	48249900.8	8041650.1	3.94	0.0014
Cons*temper*tempo	3	53407403.9	17802468.0	8.73	<.0001
Mate*temper*tempo	2	61835942.1	30917971.0	15.16	<.0001
<b>Cons*mate*temp*tempo</b>	<b>6</b>	<b>62597328.2</b>	<b>10432888.0</b>	<b>5.12</b>	<b>0.0001</b>
Error	96	195756166.9	2039126.7		
Corrected Total	143	952820454.3			

**Comparação múltipla de médias através do método de Tukey. Aço**  
= aço inoxidável; Polipro = polipropileno.

		<i>4H</i>			<i>8H</i>		
		<b>AÇO</b>	<b>POLIPRO</b>	<b>VIDRO</b>	<b>AÇO</b>	<b>POLIPRO</b>	<b>VIDRO</b>
<b>10 °C</b>	<b>SA</b>	54,20 b	216,80 b	0,00 b	55,56 b	2277,78 b	0,00 b
	<b>SA/BC</b>	54,20 b	108,40 b	27,10 b	0,00 b	722,22 b	0,00 b
	<b>EC/SA</b>	0,00 b	0,00 b	54,20 b	0,00 b	166,67 b	0,00 b
	<b>EC/SA/BC</b>	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	277,78 b	0,00 b
<b>25 °C</b>	<b>SA</b>	1490,19 b	<b>10862,75 a</b>	254,90 b	1540,00 b	3180,00 b	86,67 b
	<b>SA/BC</b>	78,43 b	2117,65 b	117,65b	380,00 b	1393,33 b	<b>11800,00 a</b>
	<b>EC/SA</b>	0,00 b	1254,90 b	39,22 b	86,67 b	193,33 b	10,00 b
	<b>EC/SA/BC</b>	0,00 b	1058,82 b	196,08 b	46,67 b	500,00 b	1146,67 b

### 7.3 *Bacillus cereus* (BC)

Fonte de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	p-value
Consórcio	3	6676956.18	2225652.06	2.18	0.0950
material	2	17951298.51	8975649.25	8.81	0.0003
temperatura	1	13244955.52	13244955.52	12.99	0.0005
Tempo	1	14363117.02	14363117.02	14.09	0.0003
Cons*mate	6	20917741.00	3486290.17	3.42	0.0042
Cons*temper	3	5795878.93	1931959.64	1.90	0.1355
Cons*tempo	3	5664931.25	1888310.42	1.85	0.1428
mate*temper	2	16912546.92	8456273.46	8.30	0.0005
mate*tempo	2	12953212.13	6476606.06	6.35	0.0026
temper*tempo	1	30801403.13	30801403.13	30.22	<.0001
Cons*mate*temper	6	20845088.01	3474181.34	3.41	0.0043
Cons*mate*tempo	6	19226009.07	3204334.85	3.14	0.0074
Cons*temper*tempo	3	6499375.57	2166458.52	2.13	0.1020
mate*temper*tempo	2	17539735.66	8769867.83	8.60	0.0004
<b>Cons*mate*temp*tempo</b>	<b>6</b>	<b>20565264.48</b>	<b>3427544.08</b>	<b>3.36</b>	<b>0.0047</b>
Erro	96	97852580.4	1019297.7		
Total	143	327810093.8			

**Comparação múltipla de médias através do método de Tukey.** Aço = aço inoxidável; Polipro = polipropileno; Temper.=temperatura de incubação;

Consórcio	Mater.	Temper.	Tempo	y LSMEAN	
BC	AÇO	10 °C	4H	333.33333	1
BC	AÇO	10 °C	8H	123.45679	2
BC	AÇO	25 °C	4H	11.76471	3
BC	AÇO	25 °C	8H	5.24934	4
BC	POLIPRO	10 °C	4H	666.66667	5
BC	POLIPRO	10 °C	8H	0.00000	6
BC	POLIPRO	25 °C	4H	129.41176	7
<b>BC</b>	<b>POLIPRO</b>	<b>25 °C</b>	<b>8H</b>	<b>7937.00787</b>	<b>8</b>
BC	VIDRO	10 °C	4H	250.00000	9
BC	VIDRO	10 °C	8H	61.72840	10
BC	VIDRO	25 °C	4H	0.00000	11
BC	VIDRO	25 °C	8H	955.38058	12
EC/BC	AÇO	10 °C	4H	1000.00000	13
EC/BC	AÇO	10 °C	8H	370.37037	14
EC/BC	AÇO	25 °C	4H	3.92157	15
EC/BC	AÇO	25 °C	8H	8.39895	16
EC/BC	POLIPRO	10 °C	4H	416.66667	17
EC/BC	POLIPRO	10 °C	8H	61.72840	18
EC/BC	POLIPRO	25 °C	4H	74.50980	19

### Continuação – APÊNDICE 7

<i>Consórcio</i>	<i>Mater.</i>	<i>Temper.</i>	<i>Tempo</i>	<i>y LSMEAN</i>	
EC/BC	POLIPRO	25 °C	8H	1884.51444	20
EC/BC	VIDRO	10 °C	4H	0.00000	21
EC/BC	VIDRO	10 °C	8H	30.86420	22
EC/BC	VIDRO	25 °C	4H	0.98039	23
EC/BC	VIDRO	25 °C	8H	1556.43045	24
EC/SA/BC	AÇO	10 °C	4H	166.66667	25
EC/SA/BC	AÇO	10 °C	8H	0.00000	26
EC/SA/BC	AÇO	25 °C	4H	5.88235	27
EC/SA/BC	AÇO	25 °C	8H	5.24934	28
EC/SA/BC	POLIPRO	10 °C	4H	666.66667	29
EC/SA/BC	POLIPRO	10 °C	8H	30.86420	30
EC/SA/BC	POLIPRO	25 °C	4H	188.23529	31
EC/SA/BC	POLIPRO	25 °C	8H	2194.22572	32
EC/SA/BC	VIDRO	10 °C	4H	41.66667	33
EC/SA/BC	VIDRO	10 °C	8H	-0.00000	34
EC/SA/BC	VIDRO	25 °C	4H	0.98039	35
EC/SA/BC	VIDRO	25 °C	8H	280.83990	36
SA/BC	AÇO	10 °C	4H	250.00000	37
SA/BC	AÇO	10 °C	8H	61.72840	38
SA/BC	AÇO	25 °C	4H	7.84314	39
SA/BC	AÇO	25 °C	8H	18.37270	40
SA/BC	POLIPRO	10 °C	4H	500.00000	41
SA/BC	POLIPRO	10 °C	8H	30.86420	42
SA/BC	POLIPRO	25 °C	4H	47.05882	43
SA/BC	POLIPRO	25 °C	8H	1034.12073	44
SA/BC	VIDRO	10 °C	4H	0.00000	45
SA/BC	VIDRO	10 °C	8H	0.00000	46
SA/BC	VIDRO	25 °C	4H	-0.00000	47
SA/BC	VIDRO	25 °C	8H	3270.34121	48

## 8. VITA

**Nome completo:** Juliana Flach

**Data e local de nascimento:** 12/01/1983, Salvador do Sul/RS

**Filiação:** Imelda Flach e José Inácio Flach

**Formação:**

**2000 – 2004:** Ensino Superior: Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas – UFRGS, Porto Alegre, RS.

**1997 – 1999:** Ensino Médio: Colégio São Pedro – Porto Alegre/RS

**1988 – 1996:** Ensino Fundamental: Escola Estadual de Ensino Fundamental Cônego Caspary – Linha Francesa Alta, Barão/RS.

**Atividades Profissionais:**

**2003 – 2004:** estágio no Departamento de Ciência dos Alimentos ICTA/UFRGS sob a orientação do Prof. Dr. José Maria Wiest. Vínculo: bolsista Fapergs. Atividades de iniciação científica e extensão universitária.

**2000 – 2003:** estágio no Departamento de Microbiologia ICBS/UFRGS, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Gertrudes Corção. Vínculo: bolsista Trabalho (SAE – UFRGS), bolsista CNPq. Atividades de iniciação científica ligadas a projetos de

mestrado orientados pela Prof<sup>a</sup> Dra. Gertrudes Corção e atividades de extensão universitária.