



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Cleber Daniel Martins Alvarenga

**AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *SALMONELLA*
ENTÉRICA SOROVAR TYPHIMURIUM, *ESCHERICHIA COLI*,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM
AÇO INOXIDÁVEL AISI 304**

DOURADOS, MS

DEZEMBRO

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Cleber Daniel Martins Alvarenga

**AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *SALMONELLA*
ENTÉRICA SOROVAR TYPHIMURIUM, *ESCHERICHIA COLI*,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM
AÇO INOXIDÁVEL AISI 304**

Trabalho de conclusão de curso apresentado á
Universidade Federal da Grande Dourados,
como parte das exigências do Curso de Gra-
duação em Biotecnologia, para obtenção do
título de Biotecnologista, sob orientação da
Prof^ª.Dr^ª. Kelly Mari Pires de Oliveira.

DOURADOS, MS

DEZEMBRO

2014

AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *SALMONELLA*
ENTÉRICA SOROVAR TYPHIMURIUM, *ESCHERICHIA COLI*,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM AÇO
INOXIDÁVEL AISI 304

Por

Cleber Daniel Martins Alvarenga

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Biotecnologista.

Aprovado em: / /

Prof^a..Dr^a. Kelly Mari Pires de Oliveira

Orientadora- UFGD/FCBA

Me.^a Adriana Araújo

Membro da Banca- UFGD/FCBA

Me.^a Fabiana Gomes de Carvalho

Membro da Banca- UFGD/FCBA

Dedico esta vitória à minha família, em especial ao meu amado Pai Miguel Sánchez e minha amada mãe Maria Aparecida, aos meus irmãos Ronaldo e Ângelo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, saúde, disposição proporcionada para vencer mais esta etapa de minha vida, pelos conselhos nos momentos mais difíceis encontrados durante esta caminhada.

Agradeço a meus pais por acreditarem em mim, e me darem suporte para conseguir chegar até aqui, por não me deixarem fraquejar nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu grande amigo Caio César Herreira, por ser um gigante companheiro durante estes quatro anos, pelos conselhos importantes no dia-a-dia e pela boa convivência.

Agradeço a dona Helena e seu Carlão pelos auxílios e me tratarem como um filho.

Agradeço aos meus primos Mirian e Gustavo por não me deixarem perder o otimismo.

Agradeço ao meu amigo Carlinhos por todos os favores oferecidos.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Kelly Mari Pires de Oliveira, pela possibilidade de desenvolvimento pessoal e acadêmico oferecido, por se preocupar comigo, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Agradeço a Me.^a Fabiana Gomes de Carvalho, pelos imensos auxílios prestados durante o desenvolvimento desta pesquisa, por sempre guiar-me dentro do laboratório.

Agradeço a todos meus amigos e colegas, que participaram de forma direta ou indireta desse processo, meu profundo obrigado.

A todos os professores do curso, que foram de fundamental importância em minha formação acadêmica.

"Bendito aquele que consegue dar aos seus filhos asas e raízes", diz um provérbio.

Precisamos das raízes: existe um lugar no mundo onde nascemos, aprendemos uma língua, descobrimos como nossos antepassados superavam seus problemas. Em um dado momento, passamos a ser responsáveis por este lugar.

Precisamos das asas. Elas nos mostram os horizontes sem fim da imaginação, nos levam até nossos sonhos, nos conduzem a lugares distantes. São as asas que nos permitem conhecer as raízes de nossos semelhantes, e aprender com eles.

Paulo Coelho

**"Deixe que seus planos sejam obscuros e impenetráveis como a noite e,
quando agir, caia como um raio"**

Sun Tzu

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microplaca de poliestireno com cupons de aço, pronta para o teste.

Figura 2. Microplaca com cupons após 24 horas à 60 rpm e 37 °C.

Figura 3. Ciclos logarítmicos das bactérias em todas as leituras.

Figura 4. Desempenho médio dos microrganismos na formação de biofilme em aço inox.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formação de biofilme em aço inox por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium na temperatura de 37 ° C, sob agitação de 60 rpm por 24 horas, os resultados estão expressos em UFC/cm².

Tabela 2. Resultado do teste de Tukey utilizado para avaliar se houve diferença estatística no processo de formação de biofilme pelas bactérias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AISI- American Iron and Steel Institute

ATCC- American Type Culture Collection

BHI- Brain Heart Infusion

°C- Graus Celsius

C- Carbono

CDC- Centers for Disease Control and Prevention

CMI- Corrosão Microbiologicamente Induzida

Cm²- Centímetros quadrados

CPP- Contagem Padrão em Placa

Cr- Cromo

Cu- Cobre

Dr- Doutor

DTA- Doenças Transmitidas por Alimentos

EAEC- *Escherichia coli* enteroagregativa

EEC- *Escherichia coli* enterovirulenta

EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC- *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC- *Escherichia coli* enteropatogênica

EPS- Exopolissacarídeos

EPF- Microscopia de Epifluorescência

ETEC- *Escherichia. coli* enterotoxigênica

H₂S- Sulfeto de Hidrogênio

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

mL- Mililitros

mm- Milímetros

Mn- Manganês

N- Nitrogênio

Ni- Níquel

Nº- Número

OD- Densidade Óptica

pH- Potencial Hidrogeniônico

ppm- Partes por Milhão

rpm- Rotação por minuto

Si- Silício

spp- Espécies

TSA- Trypticase Soy Agar

TSB- Tryptic Soy Broth

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

UFC/cm²- Unidades Formadoras de Colônias por centímetro quadrado

µL- Microlitros

µm- Micrometro

%- porcentagem

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 BIOFILME.....	3
2.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME	4
2.3 SUPERFÍCIES ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME ...	6
2.4 MICRORGANISMOS FORMADORES DE BIOFILME	7
2.4.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	7
2.4.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	8
2.4.3 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	9
2.4.4 <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SOROVAR TYPHIMURIUM	11
2.5 BIOFILME E A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	12
2.6 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME	13
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
5. ARTIGO	22
5.1 RESUMO.....	22
5.2 INTRODUÇÃO	23
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.4 AMOSTRAS	24
5.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CUPONS DE AÇO INOX	24
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
8. CONCLUSÃO	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A maior parte da atividade microbiana na natureza não ocorre com células individualizadas crescendo de maneira planctônica, mas sim em conjunto, formando estruturas organizadas (KASNOWSKI, et al., 2010). Geralmente as bactérias em seu habitat natural vivem em comunidades, associadas a uma variedade de superfícies sejam elas bióticas ou abióticas, compondo uma estrutura conhecida como biofilme. Dalton e March (1998) afirmam que cerca de 99% de todas as bactérias em ambiente natural estão na forma de biofilmes.

O biofilme é um conjunto formado por um ou mais microrganismos embebidos em uma matriz polimérica extracelular e aderidos a uma superfície de contato. A matriz polimérica é constituída por polissacarídeos, proteínas, lipídios, sais minerais, vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta, debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos (CAPELLETTI, 2006; LAWRENCE et al., 1991). Essas estruturas possuem resistências ao estresses, tais como o efeito de antimicrobianos e sanificantes, Forsythe (2002) comenta que tal resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na desinfecção dos equipamentos, aumenta consideravelmente, de 10 a 100 vezes.

Pesquisas sobre a formação de biofilme em diversas superfícies são conduzidas, no entanto destacam-se as superfícies utilizadas no processamento de alimentos, como o aço inoxidável (American Iron and Steel Institute - AISI 304, 2008).

O biofilme microbiano formado sobre superfície de manipulação de alimentos, age como ponto de contaminação constante, comprometendo, a qualidade microbiológica de produtos pré-acabados e acabados (FUSTER-VALLS et al., 2008), esse evento é encarado como grande desafio pela indústria de alimentos.

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas por agentes, os quais adentram no organismo humano através da ingestão de água ou alimentos contaminados, tais agentes podem ser de origem química, física ou biológica, como os microrganismos patogênicos, porém Greig e Ravel (2009) esclarecem que os alimentos contaminados por agentes biológicos são a maior causa dessa enfermidade, sendo estudados intensivamente durante décadas.

Tendo em vista que o aço inoxidável é o material utilizado com frequência na indústria de alimentos e o biofilme bacteriano pode estabelecer-se nesta superfície, são essenciais estudos que visem avaliar e compreender os mecanismos biológicos em que

bactérias patogênicas e alteradoras conseguem se desenvolver e alastrar-se sobre estas superfícies e consequentemente os alimentos, portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme, sobre aço inoxidável AISI 304, de quatro espécies bacterianas distintas, são elas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOFILME

Ao longo da história da microbiologia, pesquisadores verificaram que as bactérias crescem de maneira diferente após sua adesão em superfícies e posterior formação de biofilmes. Em 1964, Mitchell e Kevin Marshall, observaram pela primeira vez os estágios iniciais de formação de biofilmes por bactérias e diferenciaram-os como reversível e irreversível, este último constituindo o primeiro estado de formação dos biofilmes. Novas pesquisas e descobertas acerca dos biofilmes foram realizadas, porém as características fundamentais foram mantidas.

A maioria dos microrganismos podem adaptar-se, pois aderem-se a superfícies que estão na presença de substratos, geralmente estão contidos dentro de uma matriz orgânica polimérica de origem microbiana. Um biofilme é considerado como uma matriz biologicamente ativa formado por células sésseis de uma ou várias espécies e substâncias poliméricas extracelulares em associação com uma superfície sólida de origem biótica ou abiótica, incluindo superfícies minerais, tecidos vivos ou mortos de plantas ou animais, cerâmicas, polímeros sintéticos e aço inoxidável, podendo também ser formado na superfície da água como demonstra Davey e O'toole (2000) em um estudo efetuado. O biofilme geralmente está relacionado à persistência bacteriana e a resistência a antimicrobianos e sanitizantes, ainda a matriz que compõe o mesmo é formada por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios microrganismos (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997), Papavasileiou et al., (2010) e Joseph et al., (2001) explicam que tal perfil fenotípico de resistência aos agentes é devido a organização e características físico-químicas da matriz extracelular das células bacterianas.

Os biofilmes são constituídos, substancialmente, por células microbianas, carboidratos, proteínas e água como descreve Trostmann, Frolund E Olesen (2001). Javaherdashti (2008) alega que a água presente no biofilme corresponde cerca de 95% da massa total.

Alguns fatores intrínsecos e extrínsecos podem influenciar no processo de formação do biofilme, que merecem ênfase são eles: características do substrato, variação do pH, temperatura, presença de agentes antimicrobianos, quantidade de inóculo, forças hidrodinâmicas, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, assim como as concentrações dos metabólitos microbianos (NAVES et al., 2008), além de genes codificam a capacidade do

microrganismo em produzir exopolissacarídeos (EPS) ou a presença de flagelo, fímbria e pili que auxiliam na adesão. Durante a formação do biofilme, Donlan e Costerton (2002) relataram que, os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética.

Em pesquisas realizadas *in vitro*, alguns pesquisadores associam biofilme ao número de células aderidas à superfície de interesse (Macedo, 2000).

Andrade et al., (2008) destaca que para se considerar que células aderidas constituem um biofilme, é necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , no entanto outros autores consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 , respectivamente (RONNER E WONG 1993;WIRTANEN et al., 1996).

2.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME

Seguido do contato inicial com a superfície de adesão, os microrganismos iniciam a produção de exopolissacarídeos que podem ser observados por microscopia de força atômica ou eletrônica. Logo essas substâncias aumentam sua densidade, acarretando na formação da matriz do biofilme. A produção de exopolissacarídeos intensifica-se com a adesão da bactéria à superfície (KUMAR, 1998, BOWER et al., 1996). A formação de biofilme, resumidamente, ocorre por uma série de eventos sequenciais em que etapas importantes para a formação do biofilme, são descritas como adesões iniciais, passando os microrganismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil, à formação de microlônias, à maturação e ao destacamento de células, retornando estas a seu estilo de vida planctônico.

Ao decorrer dos estudos na área de biofilme, algumas teorias sobre a formação do mesmo foram propostas, no ano de 1971 uma das primeiras teorias foi descrita por Marshall et al., (1971), na qual observou o biofilme como um processo que ocorre em duas fases, na primeira fase o processo ainda reversível, devido a adesão do microrganismo na superfície, que ocorre por atração eletrostática, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Nesta etapa é importante levar em consideração que a bactéria apresenta movimento browniano, ou seja, pode ser removida apenas por rinsagem. Na segunda fase, outras interações são observadas, tais como: dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações iônicas e covalentes, e ainda à interação física da célula com a superfície, juntamente com a produção de material extracelular de natureza protéica ou polissacarídica, pelo microrganismo, também conhecida como matriz de glicocálix, que suporta a formação de

biofilmes. Macedo (2000) descreve que a formação do glicocálix se dá após o processo de adesão superficial, fornecendo suporte para adesão do peptideoglicano das bactérias gram positivas e a parte externa da membrana externa das gram negativas. Observa-se neste estágio, que as fimbrias poliméricas ligam o microrganismo ao substrato, tornando difícil a remoção do biofilme, sendo necessário além da simples rinsagem, adotar forças mecânicas, como lavagem ou raspagens (CAIXETA, 2008).

De acordo com Mittelman (1998) e Dunne Júnior (2002) a adesão bacteriana e a formação de biofilme ocorrem essencialmente em três estágios, no qual o primeiro consiste na cobertura rápida da superfície com filmes de condicionamento orgânico, que pode ser componentes proteicos do leite, do sangue, como albumina, entre outros. No segundo estágio de adesão, células bacterianas são transportadas para a superfície, resultando em laços reversíveis entre a parede celular e o substrato. No terceiro e último estágio, a maturação, formada de um filme de condicionamento orgânico, em que sucessões de bactérias colonizadoras ligam-se ao seu exopolissacarídeo e a várias partículas detritivas.

Porém um modelo comum proposto para a formação, diferenciação e constituição do biofilme maduro é normalmente dividido em 5 etapas, que compreendem: primeira etapa, as bactérias livres ou planctônicas estão dispersas no meio e começam a se aproximar de superfície sólida por fluxo fluido ou por sua motilidade, os microrganismos devem superar as forças de repulsão entre a célula e a superfície. No segundo estágio, ocorre a transição do estado reversível para o irreversível, devido a produção de polímeros extracelulares pelos próprios microrganismos e, ou, por proteínas específicas conhecidas como adesinas, localizadas na pili ou fimbrias, que interagem com a superfície, tornando o microrganismo imobilizado ao substrato, no terceiro estágio os microrganismos iniciam sua multiplicação na superfície de contato e a formação de uma monocamada. No quarto estágio desenvolvem-se agrupamentos de bactérias conhecido como microcolônias dentro do biofilme maduro. Neste estágio substâncias poliméricas extracelulares servem como uma matriz adesiva e possibilitam acesso aos nutrientes. Além de, uma complexa estrutura composta por pilares de bactérias envoltas de canais de água que possibilitam o acesso de nutrientes e oxigênio no interior do biofilme e também permite a excreção de metabólitos para fora da estrutura. E por fim no quinto e último estágio, ocorre a dispersão de células do biofilme e o retorno de células planctônicas, caracterizando o reinício do ciclo (DONLAN; COSTERTON, 2002, DAVEY; O'TOOLE, 2000, DUNNE, 2002, STOODLEY et al., 2002, VAN HOUTD; MICHIELS, 2005).

2.3 SUPERFÍCIES ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Dunne junior (2002) e Resende (2005) afirmam que grande parte dos microrganismos são capazes de aderir e formar biofilmes, em superfícies de origem bióticas, como abióticas, incluindo desde cascos de navios, lentes de contatos, encanamento de indústria de alimentos e petróleo, pedras em cursos d'água e sílica, alumínio, vidro, aço inoxidável, teflon, materiais de náilon, borracha encontrados em ambientes utilizados para processar alimentos e até uma parte de implantes e aparelhos transcutâneos.

É imprescindível ressaltar que, características macroscópicas, e especialmente, as microscópicas, das superfícies onde os microrganismos aderem-se, são determinantes à eficiência de adesão microbiana, influenciando também a contaminação dos alimentos por microrganismos alteradores ou patogênicos (Andrade, 2004), pois, a microtopografia característica estrita para cada superfície pode atuar dificultando os procedimentos de limpeza, quando fendas e outras imperfeições criam condições para abrigar células, consequentemente contribuindo para formação de biofilme nessas regiões.

Donlan (2002) apud por Silva (2011) salienta que, a hidrofobicidade da superfície microbiana, também é importante no processo de adesão, devido ao fato de que as interações hidrofóbicas aumentarem com a adição da natureza apolar de uma ou ambas superfícies envolvidas, isto é, o microrganismo e o substrato. Ou melhor, microrganismos com uma superfície celular hidrofóbica demonstram-se mais eficiente para aderirem-se em superfícies hidrofóbicas como afirma Hori & Matsumoto (2010).

O aço inoxidável tipo AISI 304 é um dos materiais mais utilizados em diferentes equipamentos na indústria de processamento de alimentos, está presente em superfície de trabalho, pias, tanques e tubulações, justifica-se devido sua força mecânica, resistência à corrosão, longevidade e facilidade de fabricação (ARAÚJO, 2010). Segundo Castro et al.,(2007) sua composição química é C – 255 ppm; Si – 0,44; Mn – 1,13; Cr – 18,23; Ni – 8,91; Cu – 0,23; N – 474, valores dados em % de peso. Quando comparado a outros materiais apresenta maior resistência a agentes oxidantes e outros agentes sanificantes utilizados no processo de higienização de uma indústria de alimentos, como ácido peracético, iodóforos e hipocloritos.

2.4 MICRORGANISMOS FORMADORES DE BIOFILME

Dalton e March (1998) enfatizam que cerca de 99% de todas as bactérias em ambiente natural estão na forma de biofilmes. Os biofilmes geralmente estão compostos de uma comunidade de microrganismos, de uma única ou de várias espécies, ou seja, quando o biofilme é composto por diferentes espécies, os produtos metabolizados por uma espécie pode servir de suporte para o crescimento de outras, enquanto a adesão de algumas espécies pode fornecer ligantes que promovem a ligação de outras (CAIXETA, 2008). Em contrapartida, pode haver também a competição por nutrientes, e a produção de substâncias tóxicas que inibem o crescimento dos microrganismos.

2.4.1 ESCHERICHIA COLI

A bactéria *Escherichia coli*, foi descrita pelo Dr Theodor Escherich no ano de 1885, na tentativa de isolar o agente etiológico da cólera (Escherich, 1889; Adam & Moss, 1997). Pertencente a família *Enterobacteriaceae*, bastonete gram-negativa, não esporulada, oxidase negativa, anaeróbia-facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, pode apresentar mobilidade por flagelos peritríquios ou não.

Faz parte da flora intestinal normal de animais de sangue quente, como um exemplo o homem. As maiorias dos sorogrupos de *Escherichia coli* fazem parte da flora comensal do intestino dos mamíferos. Por isso um dos parâmetros adotado pelo Brasil em concordância com a Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, a *Escherichia coli* serve como indicador da qualidade da água (BRASIL, 2011) e da contaminação fecal de alimentos. Apesar disso, certos sorotipos são prejudiciais aos animais e homens e estes não fazem parte da flora intestinal normal. O contato com esses certos sorotipos pode causar infecções, que são transmitidas predominantemente por três vias, são elas: o contato direto com animais, o contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1997).

Alguns sorotipos desses microrganismos, conhecidos como *Escherichia coli* enterovirulenta (EEC), podem causar doenças nos animais e também no homem. Varman e Evans (1996) e Hobbs e Robert (1999), classificam estes em cinco classes distintas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

A capacidade de formação de biofilme pela *E. coli*, esta fortemente relacionado a disposição de nutrientes no meio (IZQUIERDO & HERNÁNDEZ, 2002), ou seja, ambientes que apresentam uma variedade de nutrientes podem favorecer a formação de biofilme para esta espécie.

2.4.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

As espécies do gênero *Pseudomonas* são definidas com base em várias características fisiológicas, no entanto, o termo “*aeruginosa*” refere-se à característica da coloração azul esverdeada, formada pelo microrganismo devido a produção de piocianina (NOUÉR, 2005).

O microrganismo pode sobreviver em vários habitats, consiste em bastonetes gram-negativos aeróbicos que se locomovem por apenas um flagelo polar ou por meio de tufo, e ainda é oxidase positiva (TORTORA, 2012). Além disso, não é fermentadora de carboidratos, é produtora de 3-citocromo-oxidase, utiliza o nitrato em substituição do oxigênio como aceptor final de elétrons, produzindo também arginina desidrolase e ornitina-decarboxilase (FERREIRA, 2005).

A *Pseudomonas aeruginosa*, é um dos microrganismos muito bem estudados quanto à formação do biofilme, é bastante empregada como modelo para o estudo do biofilme e a estrutura assumida por essa bactéria é geralmente mostrada como típica para o biofilme bacteriano maduro (COSTERTON, et al., 1999).

Cappello & Guglielmino (2006) acreditam que, vários fatores extracelulares e de superfície sintetizados por esse microrganismo contribuem para sua virulência, porém a capacidade de adesão em superfícies inanimadas ou biológicas é um estágio importante na infectividade.

No âmbito da saúde, a *P. aeruginosa*, pode crescer dentro de um ser humano sem causar doenças, entretanto se essa bactéria formar biofilme ela ataca o sistema imune do hospedeiro, podendo colonizar os pulmões de pacientes com fibrose cística e é uma das principais causas de mortes nestes pacientes (TORTORA, 2012). Vale ressaltar que, esta espécie é o pseudomônio mais isolado em caso de infecções hospitalares, ainda é um dos patógenos mais relevantes ligados à Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (WINGENDER e FLEMMING, 2011). Os biofilmes formados por esta têm sido descritos como altamente resistente aos agentes de desinfecção, e foram considerados muito importantes quando presente na indústria de laticínios (KUDA; YANO; KUDA, 2007).

Conforme Guahyba (2003), a presença desta, em altas concentrações no final do processamento resulta na redução da vida de prateleira dos produtos refrigerados, devido à produção do muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis, sendo, portanto, seu estudo de grande importância para a indústria de alimentos. Basta ver que, *P. aeruginosa* apresenta tolerância a uma ampla variedade de condições físicas, sua veiculação nos alimentos permite que se comporte como um patógeno oportunista eficaz, o que faz com que o cumprimento das condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de fabricação (BPF), sejam de extrema importância, no intuito de evitar a formação de biofilme pelo microrganismo nas indústrias de processamento de alimentos, que como já citado compromete o produto final e a saúde do consumidor.

2.4.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e atualmente é um dos microrganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo. Pertencente à família Micrococcaceae, apresentam uma forma de coco, quando em conjuntos tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. São gram positivos, possuindo diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μm , imóveis e não formam esporos. Possuem metabolismo fermentativo e respiratório, neste último, vindo a produzir catalase (KLOOS; BANNERMAN, 1999). O *Staphylococcus aureus*, assim denominado devido a pigmentação amarelada das suas colônias, é tolerante a altas concentrações de cloreto de sódio; ele também pode fermentar o carboidrato manitol para formar ácido (TORTORA, 2012), essas características normalmente, são exploradas em meios de cultivo para selecionar o microrganismo.

Os *S. aureus* são geralmente encontrados colonizando na pele e membranas mucosas de humanos. Altas concentrações do mesmo podem estar colonizando as axilas, porção anterior das narinas e o períneo. No entanto, essas bactérias também podem estar distribuídas em outros locais, como orofaringe, boca, vagina, trato intestinal e glândulas mamárias (WERTHEIM et al., 2005), é evidente que o próprio homem é o seu reservatório, estima-se que destes citados as narinas possuem o maior índice de colonização, chegando até 40% nos adultos.

O *S. aureus*, também é o principal patógeno ligado a algumas manifestações clínicas, tais como pneumonia, septicemia, infecções de feridas e endocardite em países desenvolvidos

como também aqueles que estão em desenvolvimento. É um microrganismo especial quando comparado a outros clinicamente relevantes, devido a presença de três características fundamentais: apresenta uma série de fatores de virulência, capacidade crescente de desenvolver resistência a antibióticos, e é frequentemente responsável por infecções nosocomiais e comunitárias (JACOBSSON, 2009). Ademais, Davis (2005) cita a possibilidade de formação de biofilme por *S. aureus* na superfície de materiais estranhos ao organismo, como cateteres endovenosos e próteses, que funcionam como locais protegidos contra a ação de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro.

No que diz respeito aos alimentos o microrganismo pode acarretar doenças transmitidas por alimentos (DTA), mais especificamente intoxicações alimentares, pois, tem a capacidade de produzir sete toxinas diferentes que são frequentemente responsáveis por este tipo de intoxicação. Uma intoxicação alimentar estafilocócica, é uma doença gastrointestinal, causada pela ingestão de alimentos contaminados com as toxinas desta bactéria, a maneira mais comum dos alimentos serem contaminados com *Staphylococcus* é através do contato com os trabalhadores de alimentos que carregam as bactérias (CDC, 2006), ou ainda superfícies de contato das áreas de processamento do alimento, que por ventura estão contaminadas por este, conseqüentemente podem aderir-se na superfície e formar biofilmes. Bactérias aderidas na forma de biofilme podem soltar-se durante a produção e contaminar os alimentos à medida que passam sobre as superfícies de processamento, ou seja, esta contaminação cruzada é uma fonte de alto risco de bactérias patogênicas que podem afetar a segurança e a qualidade do alimento. O *Staphylococcus aureus* é um dos exemplos mais comuns de bactérias patogênicas isolados a partir de superfícies em plantas de processamento de alimentos (Pastoriza et al., 2002), visto que, ele é capaz de sobreviver e se multiplicar sobre as superfícies de processamento de alimentos. É importante considerar que, no cenário epidemiológico mundial este microrganismo é considerado como o terceiro mais relevante causa de doenças transmitidas por alimentos (DTA).

2.4.4 SALMONELLA ENTERICA SOROVAR TYPHIMURIUM

O gênero *Salmonella* foi inicialmente caracterizado em 1885, tendo sua denominação em homenagem ao patologista Daniel Salmon. Correspondente a família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Salmonella* compreende bacilos Gram negativos e compõe um dos grupos mais complexos. São anaeróbias facultativas, usualmente móveis com flagelos peritríquios, apresentam condições ótimas de crescimento pH 7,0, temperatura de 37°C e atividade da água a 0,94 (TORTORA et al., 2012), medem de 2-4mm de diâmetro; são arredondadas com bordas lisas, um pouco elevadas e brilhantes. Seu perfil bioquímico é caracterizado por produção de ácido sulfídrico e gás carbônico a partir da glicose e outros carboidratos, em exceção a sacarose e a lactose. Ainda, são oxidase catalase positivas, podem multiplicar-se utilizando apenas o citrato como única fonte de carbono. Em suma produzem ácido sulfídrico (H₂S), e mais descarboxilam a ornitina e a lisina e não hidrolisam a uréia (FRANCO, 1996), tais características de seu perfil bioquímico geralmente são utilizadas para sua caracterização e diferenciação dos diversos biótipos existentes.

De acordo com Lutful Kabir, (2010) mais de 2500 sorotipos dessa bactéria já foram isolados. No entanto a *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium geralmente representam os dois principais sorotipos nas toxinfecções alimentares no homem. O microrganismo está amplamente disperso na natureza, habitando em especial o trato intestinal dos seres humanos e outros animais. O principal portador e reservatório natural são as aves, nestas elas não apresentam sinais clínicos e persistem no intestino.

A transmissão de *salmonela spp.* para o ser humano está, geralmente, relacionado ao consumo de alimentos contaminados de origem animal ou vegetais minimamente processados, porém a transmissão de pessoas para pessoas pode ocorrer nos hospitais, ou, ainda, o contato com animais infectados. O sorotipo *Typhimurium* é o sorotipo de *Salmonella* mais comum nos Estados Unidos, responsável por 19% de todas as infecções por *Salmonella* em seres humanos, estima-se que aproximadamente 7.000 infecções por *S. Typhimurium* são relatados ao CDC a cada ano (CDC, 2009). Uma pesquisa desenvolvida por Duong no ano de 2012, avaliou a capacidade de formação de biofilme da *S. Typhimurium* em acrílico e aço inoxidável, os resultados obtidos revelaram que, o microrganismo tinha capacidade de aderir nas duas superfícies, mas a adesão foi mais significativa em aço inoxidável. Ainda, a sua capacidade de formar biofilme é um fator de permanência no ambiente determinante na contaminação por fômites e equipamentos na indústria (CASTELIJN et al., 2013).

2.5 BIOFILME 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 comum. No entanto, tal processo de automatização das indústrias e o surgimento de equipamentos mais complexos, propiciam um grande número de possibilidades para adesão e o crescimento de microrganismos, contribuindo para o aumento da ocorrência de biofilmes (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000) se não for tomado as devidas precauções. Os biofilmes atraem cada vez mais a atenção dos pesquisadores de diversas áreas, tais como nos ramos da indústria farmacêutica, medicina, ambiente aquático e, principalmente, indústria de processamento de alimentos (CAIXETA, 2008).

Pereira (2001) cita em uma pesquisa desenvolvida que, os biofilmes prejudiciais são conhecidos como sujamento biológico ou “biofouling” estes surgem, na maioria dos sistemas industriais, comumente ligados a outros tipos de sujamentos, chamados de (“fouling”), originados da deposição de partículas inorgânicas, precipitados cristalinos e/ou produtos de corrosão, dessa forma a presença de biofilmes em áreas de processamento de alimentos é caracterizada, inicialmente, pelo acúmulo de matérias orgânicas e inorgânicas em superfícies sobre as quais ocorrem interações entre os microrganismos e as superfícies, que iniciam multiplicação celular para o desenvolvimento da comunidades bacteriana, quando a massa bacteriana é suficientemente espessa para agregar nutrientes, resíduos e até mesmo outros organismos, diz-se que o biofilme está estabelecido. Estes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, com o passar do tempo, partes deles desprendem-se e contaminam outras superfícies ou produtos alimentícios que passam pelo local (JOSEPH, 2001) ou via exposição a aerossóis originados dessas superfícies, causando um prejuízo econômico e aumentando consideravelmente o risco de ocorrência de toxinfecções alimentares.

A higienização na indústria de alimentos tem por objetivo principal preservar a qualidade microbiológica dos alimentos, pelo controle e pela prevenção da formação de biofilme ocasionada por microrganismos, auxilia na obtenção de produtos que tenham qualidades nutricionais e sensoriais, além de boa condição higiênico-sanitária, reduzindo consideravelmente o risco à saúde do consumidor. Falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos a superfícies e utensílios possibilitem a formação de biofilme e tornem-se potencial fonte de contaminação crônica, comprometendo a qualidade do alimento e representando graves riscos a saúde pública. Oliveira (2010) enfatiza que células sésseis presentes no biofilme, reduzem a eficiência vida útil dos equipamentos, em função do

fenômeno denominado corrosão microbiologicamente induzida (CMI) ou biocorrosão, são mais resistentes ao processo de desinfecção, ainda, prejudicam a transferência de calor entre as superfícies, em consequência, há perdas de energia, relacionadas com o aumento do atrito e despesas acrescidas de manutenção pela substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, além da diminuição da qualidade dos produtos em resultado das contaminações.

É imprescindível ressaltar o estudo desenvolvido por Cabeça (2006), no qual cita que as superfícies de aço inoxidável utilizadas em plantas e equipamentos de manipulação, estocagem ou processamento de alimentos, são reconhecidas como as principais fontes de contaminação microbiana.

2.6 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

Ao decorrer dos estudos sobre biofilmes, várias metodologias foram descritas para enumeração, amostragem, formação e desenvolvimento do mesmo *in vitro*. Podem-se dividir esses métodos em duas vertentes: os métodos teste em laboratório não visuais e os métodos teste em laboratório visuais. As metodologias teste em laboratório não visuais consistem na remoção dos microrganismos da superfície, e posterior contagem por métodos convencionais microbiológicos (swab, rinsagem, raspagem, contagem padrão em placas, e outros) destas citadas destaca-se uma técnica muito empregada é a de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/cm²) provenientes do biofilme formado sobre os cupons do material de interesse (MANIJEH et al., 2008), esta técnica é amplamente utilizada nos testes laboratoriais, apesar de ser altamente dispendiosa.

Nos métodos teste em laboratórios visuais, são empregadas as diversas microscopias, entre elas a confocal, contraste de fase, epifluorescência, eletrônica de varredura (MEV), eletrônica de força atômica e outras. A microscopia eletrônica é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme, nesta metodologia a fixação das amostras é realizada utilizando-se agentes químicos, paraformaldeído, glutaraldeído, entre outros, ou criofixadas, em que a amostra é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (COSTA, 1999). A microscopia confocal é empregada para observar a estrutura dos biofilmes, permitindo efetuar o seccionamento óptico do biofilme no seu estado hidratado de um modo não destrutivo, consequentemente, obtêm-se informações 3D da estrutura (LAWRENCE & NEU, 1999). Já a microscopia de contraste é recomendada para

acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real, porém deve ser numa superfície transparente. A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa eficiente na quantificação de células aderidas às superfícies transparentes ou não, nesta técnica as bactérias são coradas com substâncias fluorescentes, geralmente o alaranjado de acridina. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é de alta resolução e permite analisar a interação microbiana na matriz do biofilme. Finalmente a microscopia eletrônica de força atômica, não necessita de preparo antecipado das amostras e possibilita a caracterização das propriedades das superfícies.

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de formação de biofilme em aço inoxidável AISI 304 por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se há formação de biofilme pelas bactérias em aço inoxidável AISI 304.
- Se houver formação, avaliar a capacidade de formação de biofilme pelas bactérias em aço inoxidável, mensurando se houve ou não diferença estatística entre as bactérias formadoras.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.R. MOSS, M.O. **Microbiologia de los alimentos**. 1º ed. Zaragoza (Espanha): Editorial Acribia. 1997. 463p. Traduzido por Manuel Ramis Verges.

AMERICAN IRON AND STEEL INSTITUTE - AISI. Southfield: **AISI**, 2008. Disponível em: <<http://www.steel.org>>. Acesso em: 17/12/2013.

ANDRADE., N. J. **Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios**. In: WORKSHOP SOBRE DESENVOLVIMENTO NO SETOR DE LEITE, 2., 2004, Viçosa. Anais... Viçosa, MG: UFV, 2004, 14 p.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 2008. 400 p.

ARAÚJO, E. A. A., ANDRADE, N. J.; CARVALHO, A. F. RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. S. **Aspectos coloidais de adesão de micro-organismos**. *Quim. Nova*, Vol. 33, Nº. 9, 1940-1948, 2010.

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*, v. 7, May, p.152-157, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 mar., 2011.

CABEÇA, T. K. **Suscetibilidade de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente a desinfetantes**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável** / Danila Soares Caixeta. – Lavras: UFLA, 2008. 75p. : il.

CDC. (2006) **Content source: National Center for Immunization and Respiratory Diseases: Division of Bacterial Diseases**. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/staphylococcus_food_g.htm. Accessed Nov. 13, 2013.

CDC. **2008-2009 *Salmonella Typhimurium* outbreak response Nov 2008- March 2009**. Available at: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium/SalmonellaTyphimuriumAAR.pdf>. Accessed Jan. 18, 2014.

CAPELLETTI, Raquel Vannucci. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CAPELLO, S.; GUGLIELMINO, S. P. P. **Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**. Brazilian Journal of Microbiology, n. 37, p. 205-207, 2006.

CASTRO, C.S.B.; SALES, L. S.; GONZALES. B. M. **Envelhecimento em um aço inoxidável AISI 304 contendo Martensita induzida por deformação**. Rem: Revista Escola de Minas, v. 60, n. 1 p. 111-115, jan./mar. 2007.

COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

COSTERTON, J. **Introduction to biofilm**: Discussion, Int J Antimicrob Ag., 11, 217-221, 1999.

DALTON, H. M.; MARCH, P. E. **Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling**. Current Opinion in Biotechnology, v. 9, June, p. 252-255, 1998.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics**. Microbial.Mol. Biol. Rev., v.64, p. 847-867, 2000.

DAVIS, J. S. **Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus***. Int Med J, v. 35, p. 79S-96S, 2005.

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

DUONG, N.N. H. **Formations of *Salmonella* Typhimurium biofilm under various growth conditions and its sensitivity to industrial sanitizers**. – tese – Food Science & Technology Programme Department of Chemistry National University of Singapore, Singapore 2012. 89p.

DUNNE JÚNIOR, W. M. **Bacterial adhesion: Senn any good biofilms latety?** Clinclal Microbiology, Whashington, v. 15, n.2, p. 155-166, Apr. 2002.

ESCHERICH, T. **The intestinal bacteria of the neonate and breasted infant**. Reviews Infective Disease, v. 13, p.352-356, 1889.

FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Rio de janeiro: Fundação Oswaldo Cruz/ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2005. (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária).

- FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. **Biofilms in dairy manufacturing plant: description, current concerns and methods of control.** Biofouling, v. 11, n. 1, p. 81-87, 1997.
- FRANCO, B. G. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu. 1996. 182 p.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
- FUSTER-VALLS, N. et al., **Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces.** Food Control, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.
- GUAHYBA, A. S. **Microrganismos Deteriorantes.** Centro Universitário – UNIVATES, Lajeado, RS. 2003. (Apostila Técnico em Química).
- GREIG, J.D.; RAVEL, A. **Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution.** International Journal of Food Microbiology, v. 130, pág. 77-87, 2009.
- HOBBS, B.C; ROBERTS, D. 6 edº. **Toxinfecções e controle higiênico sanitário de los alimentos.** São Paulo. Varela, 1999. 376p
- HORI. K., & MATSUMOTO, S. (2010). **Bactrial adhesion: From mechanism to control.** Biochemical Engineering Journal, 424-434..
- 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.
- JACOBSSON, G. **Invasive *Staphylococcus aureus* infections** - tese – Departament of Infectious Diseases, Institute of Biomedic Sahlgrenska Academy University of Gothenburg, Sweeden, 2009.
- JAVAHERDASHTI, R. (2008). **Microbiologically Influenced Corrosion.** Perth, Austrália: Springer.
- JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. **Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers.** International journal of food microbiology, 64:367-372, 2001.
- KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. **Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies.** Rev. Cient Eletrônica de medicina veterinária – ISSN: 1679-7353, 2010
- KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. ***Staphylococcus* and *Micrococcus*.** In: **MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H.** Manual of Clinical Microbiology American Society for Microbiology. 7th. Edition. 1999. Cap. 16, p. 264-282.

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M. **Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface.** LWT- Food Science and Technology, v.41, n. 6, p. 988-993, 2007.

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

LAWRENCE J. R.; KORBER D. R.; HOYLE B. D.; COSTERTON J.W.; CALDWELL D. E.. **Optical sectioning of microbial biofilms.** Journal of Bacteriology, v. 173, n. 20, p. 6558–6567, 1991.

LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R. **“Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms”.** Methods Enzymol, v. 310, p. 131-144, 1999.

LUTFUL KABIR, S.M. **Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns.** International Journal of Environmental Research and Public Health, v.7, p.89-114, 2010.

MACEDO, J. A. B. **Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica.** Rev. Fármac Medicam. 2000; 2(7): 19-24.

MANIJEH, M.; MOHAMED, J.; ROHA, K. K. **Biofilm formation by *Salmonella enteridis* on food contact surfaces.** Journal of Biological Sciences. 8(2): 502-505, 2008;

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. **Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces.** Journal General Microbiology, v.68, p. 337-348, 1971.

MITTELMAN, M. W. **Structure e functional characteristic of bacterial biofilms in fluid processing operations.** Symposium. Biofilms: Development and Control. Canadá, n. 81, p. 2760-2764, 1998.

NAVES, P.; PRADO, G., HUELVES, L.; GRACIA, M; RUIZ, V.; BLANCO, J; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. **Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains.** Microbial. Pathog., v. 45, p. 86-91, 2008.

NOUÉR, S.A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.** 2005. 144 p. Tese (Doutorado em Medicina- Doenças Infecciosas e Parasitárias)- Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, M. M. M. de; BRUGNERA, D. F.; PICOLLI, R. H. **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão / Microbial biofilms in the food industry: a review.** Rev. Inst. Adolfo lutz: 69(3): 277-284,jul.-set.2010.

PAPAVASILEIOU, K.; PAPAVASILEIOU, E.; TSELENI-KOTSOVILI, A.; BERSIMIS, S.; NICOLAOU, C.; IOANNIDIS, A.; CHATZIPANAGIOTOU, S. **Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella enterica***

strains isolated from children with gastroenteritis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 29, 1401-5, 2010.

PASTORIZA, L.; CABO, M.L.; BERNÁRDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; HERRERA, J.R. **Combined effects of modified atmosphere packaging and lauric acid on the stability of pre-cooked fish products during refrigerated storage.** Eur. Food Res. Technol., v.215, n.3, p.189-193, 2002.

PELCZAR, J.R.M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceito e aplicações.** São Paulo-SP: McGraw-Hill, v.2, 1997. Cap. 30, p. 371-397.

PEREIRA, Olívia Baptista de Oliveira. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme.** 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.

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.

RESENDE., J. G. O. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio.** 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

REVOLLEDO, L. **Alternativas para o controle de Salmonella.** IX Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 2008. Chapecó (SC). Anais...Chapecó, 2008. p.95-110.

RONNER,A.B.; WONG, A. C. L. **Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber.** Journal of Food Protection, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

SILVA.,P. **Utilização de THPS e xantana como estratégia para o controle da corrosão microbiologicamente induzida** / Pulkra Silva . – Recife: O Autor, 2011. Xv, 100 folhas, il., gráfs., tabs. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. **Biofilms as complex differentiated communities.** Annu. Re. microbial., v. 56, p. 187-209, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. In: **Microbiologia.** 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TROSTMANN, E., FROLUND, B., E OLSEN, B. H. (2001). **Tap water as a Hydraulic-Pressure Medium.** York: Marcel Dekker, Inc.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. **Role of Bacterial cell surface structure in *Escherichia coli* biofilm formation.** Research in Microbiology. Belgium, n. 156, p. 626-633, 2005.

VARMAN, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens**. An illustred text. Marison publishing, 1996. 501p.

WERTHEIM, H. F.; VERVEER, J.; BOELEN, H. A.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; VOS, M. C. **Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults**. Antimicrob Agents Chemother, v. 49, p. 1465-7, 2005

WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. **Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens**. International Journal of Hygiene and environmental Health, Alemanha, v. 214, n.6, p. 417-423, nov. 2011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>. Acessed: feb 3, 2014.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. **Microbial evaluation of the biotransfer potencial form surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems**. Journal of Food Protection, v.59, n.7, p.727-733, july 1996.

5. ARTIGO

AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *SALMONELLA ENTÉRICA* SOROVAR TYPHIMURIUM, *ESCHERICHIA COLI*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM AÇO INOXIDÁVEL AISI 304

Cleber Daniel Martins Alvarenga^{1*}; Kelly Mari Pires de Oliveira¹; Fabiana Gomes de Carvalho¹.

1 Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.

5.1 RESUMO

O biofilme ocorre, naturalmente, em vários tipos de ambientes. Porém, afora da sua ocorrência natural, pesquisas sobre a sua formação em diversas superfícies são conduzidas, no entanto destacam-se as superfícies utilizadas no processamento de alimentos, como o aço inoxidável, uma vez que os biofilmes podem acometer malefícios quando são persistentes nas mesmas, é importante ressaltar que, a rede de produção de alimentos, muitas vezes é um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme sobre aço inoxidável AISI tipo 304, de quatro espécies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium. Para quantificação do biofilme sobre o aço foi utilizado a técnica de adesão em cupons, logo, o biofilme formado nos cupons foi mensurado por contagem de unidades formadoras em placa. Houve diferença no desempenho de formação de biofilme entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* ($P < 0.05$). O mesmo ocorreu entre *P. aeruginosa* e *S.aureus* ($P < 0.05$). Todas as outras comparações não houve diferença estatística, inclusive a de *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*.

Palavras-chave: Superfícies de processamento de alimentos, microrganismos, malefícios.

5.2 INTRODUÇÃO

O número de surtos de doenças de origem alimentar causadas por bactérias tem aumentado nos últimos anos (SANTOS, 2004). As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas por agentes, os quais adentram no organismo humano através da ingestão de água ou alimentos contaminados, tais agentes podem ser de origem química, física ou biológica, como os microrganismos patogênicos. Os alimentos contaminados por agentes biológicos são a maior causa dessa enfermidade, sendo estudados intensivamente durante décadas (GREIG e RAVEL 2009).

Muito das contaminações que ocorre na indústria de alimentos, está diretamente relacionado com a formação de biofilme na linha de processamento, vários microrganismos estão envolvidos neste problema (HAUN, 2004), uma vez que a maioria dos microrganismos podem aderir-se à superfícies sólidas que estão na presença de substrato (TRAVAGIN, 2010). Um biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas, dentro de uma matriz polimérica microbiana, aderida a uma superfície, inerte ou biológica (COSTERTON, 1999), quando estabelecido os microrganismos podem se destacar do biofilme atuando como uma importante fonte de contaminação e danos para qualidade dos alimentos, fazendo com que produtos se tornem portadores potenciais de organismos patogênicos (MARQUES et al., 2007). O biofilme ocorre, naturalmente, em vários tipos de ambientes. Em contrapartida, afora da sua ocorrência natural, pesquisas sobre a sua formação em diversas superfícies são conduzidas, no entanto destacam-se as superfícies utilizadas no processamento de alimentos, como o aço inoxidável (American Iron and Steel Institute - AISI 304, 2008).

Tendo em vista que o aço inoxidável é o material utilizado com frequência na indústria de alimentos e o biofilme bacteriano pode estabelecer-se nesta superfície, são essenciais estudos que visem avaliar e compreender os mecanismos biológicos em que bactérias patogênicas e alteradoras conseguem se desenvolver e alastrar-se sobre estas superfícies e consequentemente os alimentos, portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme, sobre aço inoxidável AISI 304, de quatro espécies bacterianas distintas, são elas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.4 AMOSTRAS

Foram utilizadas as seguintes cepas nos ensaios: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), provenientes da American Type Culture Collection (ATCC). As amostras foram armazenadas a -85°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com glicerol.

5.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME EM CUPONS DE AÇO INOX

O teste de formação de biofilme em aço inox foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Manijeh et al., (2008) com algumas modificações.

As cepas foram reativadas em caldo Müller Hinton® por 5 horas à 37°C e inoculadas em placas de Trypticase Soy Agar (TSA) à 37°C overnight. Para o preparo do inóculo foram selecionadas três colônias, as quais foram inoculadas em 10 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) e incubados à 37°C durante 3 horas.

Os cupons de aço inoxidável (tipo 304, acabamento n°4) utilizados apresentam dimensões de 1 cm² e foram higienizados e descontaminados por escovação utilizando água e detergente neutro. Para remoção de resíduos de detergente, os cupons foram rinsados com água destilada e imersos em álcool 70%, durante 30 minutos. Após esta etapa os cupons foram secos e autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados em microplacas de poliestireno de 12 poços. O inóculo foi ajustado a uma OD₅₉₀ de 0.125 (aproximadamente 10⁸ UFC) e alíquotas de 3mL de inóculo foram distribuídas nos poços (Figura 1). As placas foram incubadas no shaker à 37°C à 60 rpm por 24 horas (Figura 2). Os ensaios foram realizados em duplicata em três momentos diferentes.

No intuito de determinar a adesão das células vegetativas nos cupons utilizou-se o método de Contagem Padrão em Placa (CPP). Os cupons foram lavados com 3 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) para remoção das células planctônicas e frouxamente ligadas ao biofilme, logo, cada cupom foi transferido para um tubo Falcon® contendo 10 mL de solução salina e homogeneizado em agitador de tubos vórtex durante 10 minutos. Das suspensões homogeneizadas no vórtex foram retiradas alíquotas de 1 mL para posterior diluições seriadas

(10^{-1} à 10^{-7}), de modo a se obterem colônias em número seguro para contagem em placa (30 e 300 colônias), em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina.

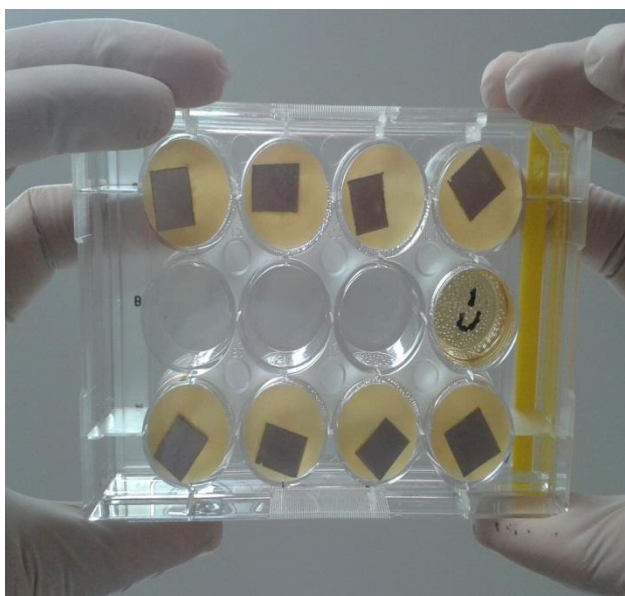
Para efetuar a quantificação das células microbianas viáveis aderidas, volumes de 100 μ L foram inoculadas, pelo método de *spread-plate*, em placas contendo Ágar TSA, as quais foram incubadas em estufa à 37°C por 24 horas, logo a contagem das colônias foi determinado o número de UFC/cm². O experimento foi realizado em duplicata e em três momentos diferentes.

Figura 1. Microplaca de poliestireno com cupons de aço, pronta para o teste



Fonte: acervo pessoal.

Figura 2. Microplaca com cupons após 24 horas à 60 rpm e 37 °C.



Fonte: acervo pessoal.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente calcularam-se as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos respectivos grupos de bactérias, obtidos esses valores em UFC/cm², realizaram-se as análises no programa estatístico **GraphPad Prism®**. Foi aplicado o teste não paramétrico de Tukey para comparar o desempenho de adesão entre cada duas classes de produção, além do uso do Bonferroni para maior garantia de controle de erro tipo I (chance de falso positivo). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se o valor-P ≤ 0.05 , quando $P \geq 0.05$, não houve diferença estatística

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se utilizar da metodologia proposta por Manijeh et al., (2008), com algumas modificações, foi possível verificar que todas as bactérias utilizadas no processo formaram biofilme, mesmo que alguns grupos apresentaram maior capacidade de formação do que outros, no entanto, é discutível a posição de autores em relação a formação de biofilme, Ronner e Wong (1993), Wirtanen et al., (1996), afirmam que biofilme é o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 , já Andrade et al., (2008) ressalta que para se considerar que células aderidas constituem um biofilme, é necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 . A tabela 1 apresenta o desempenho dos microrganismos quanto à capacidade de formação de biofilme.

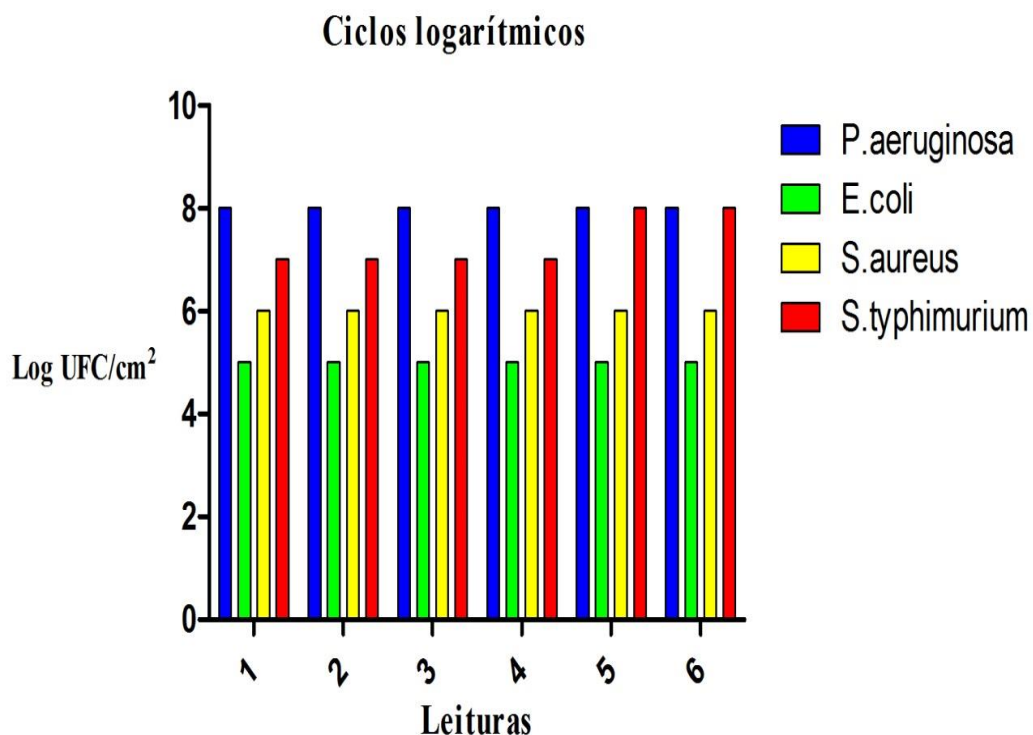
Tabela 1. Formação de biofilme em aço inox por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium na temperatura de 37 ° C, sob agitação de 60 rpm por 24 horas, os resultados estão expressos em UFC/ cm^2 .

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
1° Leitura	$1,56 \times 10^8$	$2,38 \times 10^5$	$6,9 \times 10^6$	$1,42 \times 10^7$
	$1,43 \times 10^8$	$2,35 \times 10^5$	$5,8 \times 10^6$	$1,51 \times 10^7$
2° Leitura				
	$5,7 \times 10^8$	$5,8 \times 10^5$	$1,26 \times 10^6$	$8,9 \times 10^7$
	$9,8 \times 10^8$	$5,1 \times 10^5$	$1,35 \times 10^6$	$8,7 \times 10^7$
3° Leitura				
	$6,6 \times 10^8$	$3,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$2,45 \times 10^8$
	$6,3 \times 10^8$	$3,7 \times 10^5$	$1,37 \times 10^6$	$2,27 \times 10^8$

De acordo com a tabela 1, o microrganismo que apresentou maior número de células viáveis em aço inox nas três leituras foi *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo-se o mesmo ciclo logarítmico (10^8) nas 3 leituras, seguido de *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium, mantendo os dois ciclos logarítmicos nas duas primeiras leituras (10^7) e (10^8) na última, *Staphylococcus aureus* com (10^6) em todas as leituras, por fim *Escherichia coli* com (10^5) em todas as leituras. Observa-se que todos os ciclos logarítmicos são constantes para cada espécie, exceto para *S. Typhimurium* que apresenta (10^8) na ultima análise (Figura 3), no

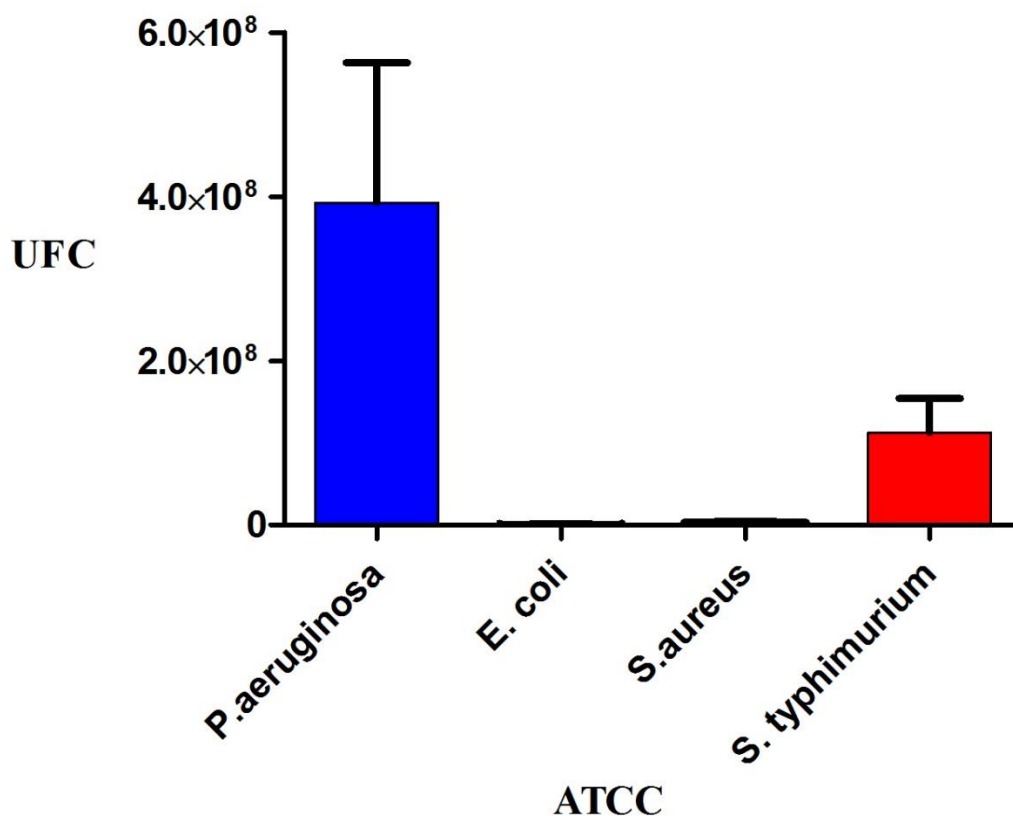
entanto, evidencia-se a variação do número de unidades formadoras de colônias de uma leitura para outra, justifica-se tal resultado, em razão de que, durante o processo de formação de biofilme as bactérias exibem diferenciados fenótipos, no que concerne à taxa de crescimento, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN e COSTERTON 2002), vários estudos sobre a base molecular e genética do desenvolvimento de biofilme tornaram claro que, quando os microrganismos mudam de seu estilo planctônico para comunidade, também sofrem alterações na atividade de vários genes (PROAL, 2008), o que poderia influenciar na homogeneidade dos dados, ou ainda, em concordância com Sule et. al. (2009) se as células das bactérias estudadas manterem-se agrupadas após a divisão celular, logo cada colônia em meio sólido seria formada por mais de uma célula.

Figura 3. Ciclos logarítmicos das bactérias em todas as leituras.



Log/UFCcm²: ciclos logarítmicos, exemplo: Log/UFCcm² 6= 10⁶, e assim sucessivamente.

Figura 4. Desempenho médio dos microrganismos na formação de biofilme em aço inox.



UFC: Unidade Formadoras de Colônias; ATCC: American Type Culture Collection.

Dentre as bactérias avaliadas, de acordo com a Figura 4, *P. aeruginosa* manifestou-se com maior desempenho para capacidade de formação de biofilme, confirmando os dados da literatura. Este microrganismo é um dos mais bem estudados em testes *in vitro* de formação de biofilme, ainda, pesquisas já descreveram que isolados de *P. aeruginosa* foram capazes de formar biofilmes com estruturas semelhantes a cogumelos, o que assinala como forte produtor de biofilme (BRIDIER et al., 2010). Algumas características que podem influenciar no processo merecem ser destacadas, tais como: a alta produção de exopolissacarídeos (EPS), que esta diretamente ligado com a formação de biofilme, pois, desencadeia a formação de uma matriz polissacarídica, o que caracteriza o estabelecimento do biofilme (FRANCO, 2010). A presença de flagelos que facilitam a adesão inicial, promovendo sua locomoção até

a superfície (GIRARDELLO, 2007), aproximando-a de seu substrato, desenvolvendo um papel chave na adesão, já o pili tipo IV permite que a bactéria mova-se sobre a superfície, permitindo a formação de microcolônias, dependendo da natureza da superfície, diferentes proteínas e fatores celulares são produzidos no processo de adesão de *P. aeruginosa*.

É importante também ressaltar que o desempenho do microrganismo também pode ser influenciado em razão da hidrofobicidade, visto que se as duas superfícies forem hidrofóbicas, a adesão pode ser termodinamicamente favorável (ARAÚJO, 2009), logo cepas com características hidrofóbicas tendem a ter melhor adesão às superfícies hidrofóbicas do que às superfícies hidrofílicas (FREITAS, 2010), neste mesmo trabalho Freitas relatou maior adesão de *Staphylococcus aureus* frente a *P. aeruginosa*, associou este resultado a hidrofobicidade do material estudado. Desta forma, *P. aeruginosa* por ser uma bactéria gram-negativa, apresenta estruturas peculiares como membrana externa, pili, fimbrias e flagelos o que confere diferentes graus de hidrofobicidade para célula e que geralmente estão associados à adesão, no que diz respeito ao aço inoxidável, neste ocorre um fenômeno denominado de passivação, onde o cromo presente no aço tende a se combinar com o oxigênio presente no meio, formando uma fina camada de óxido de cromo sobre a superfície, conferindo ao aço inoxidável hidrofobicidade (BOARI et al., 2009).

Li e Logan (2004), explicam que na indústria de alimentos, há um aumento na adesão bacteriana na presença de um líquido de baixa força iônica, devido à redução das interações eletrostáticas entre a célula microbiana e a superfície sólida. Para indústria de alimento isso é considerado ruim, já que a persistência desse microrganismo na linha de produção ou no produto pode acarretar problemas ao consumidor final.

O desempenho de formação de biofilme por *P. aeruginosa*, foi seguido da *S. Typhimurium* como observado na Figura 4, é possível também que a hidrofobicidade e os apêndices celulares tenham influenciado na capacidade de formação de biofilme, no entanto vale ressaltar, que a adesão do microrganismo é uma preocupação para indústria de alimentos, já que este sorotipo de *Salmonella* é o mais isolado em carcaças de suínos no Brasil (KICH et al., 2011; MULLER et al., 2009), além de contaminar as aves também, invadindo a corrente sanguínea e chegando a diferentes órgãos internos, favorecendo a contaminação de carcaças e ovos (REVOLLEDO, 2008).

A *S. Typhimurium* é muito estudada devido sua habilidade de infectar vários animais e por causa de suas linhagens multirresistentes a desinfetantes e antimicrobianos comuns (HOTOON et al., 2011) portanto, falhas no processo de higienização em abatedouros e salas

de cortes, podem proporcionar ambientes favoráveis para desenvolvimento e estabelecimento do biofilme por *S. Typhimurium* ocasionando graves problemas na indústria de alimentos, posto que, esse sorotipo pode determinar doença gastrointestinal em amplo espectro de hospedeiros (VOLF et al., 2012).

O desempenho médio do *Staphylococcus aureus*, foi um pouco maior que o da *Escherichia coli* confirmando dados da literatura de que o *S. aureus* adere preferencialmente à superfície metálica (CRISTINA, 1987), neste caso a hidrofobicidade não influenciou, uma vez que, o microrganismo *S. aureus* é gram-positivo e *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, porém Izquierdo & Hernández (2002) explicam que a capacidade de *E. coli* formar biofilmes é fortemente influenciada pelo ambiente nutricional disponível, proporcionado, nesse caso, por meios de cultura com diferentes composições.

Para verificar se houve diferença estatística no desempenho dos microrganismos no processo de formação de biofilme realizou-se o teste de Tukey no software GraphPad Prism®, cujo resultado pode ser observado na Tabela 2.

Tabela. 2 Resultado do teste de Tukey utilizado para avaliar se houve diferença estatística no processo de formação de biofilme pelas bactérias.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Significant? P <0.05?	Summary
<i>P.aeruginosa</i> vs <i>E. coli</i>	3.919e+008	Yes	*
<i>P.aeruginosa</i> vs <i>S.aureus</i>	3.898e+008	Yes	*
<i>P.aeruginosa</i> vs <i>S. Typhimurium</i>	2.799e+008	No	NS
<i>E. coli</i> vs <i>S.aureus</i>	-2.098e+006	No	NS
<i>E. coli</i> vs <i>S. Typhimurium</i>	-1.120e+008	No	NS
<i>S.aureus</i> vs <i>S. Typhimurium</i>	-1.120e+008	No	NS

NS/NO- Não houve diferença significativa $P > 0.05$; Yes/*- Houve diferença significativa a $P < 0.05$; Mean Diff- Diferença média entre os grupos comparados.

Conforme a Tabela 2, estatisticamente houve diferença no desempenho de formação de biofilme entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* ($P < 0.05$), isso quer dizer que

P. aeruginosa possui maior capacidade de formação de biofilme que a *E. coli*, ou, que a formação de biofilme por *P. aeruginosa* foi estatisticamente maior que a *E. coli*. O mesmo ocorreu entre *P. aeruginosa* e *S.aureus*. Todas as outras comparações não houve diferença estatística, inclusive a de *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*, ou seja, ambas bactérias possuem alto desempenho para formação de biofilme, o que é preocupante já que estes microrganismos podem trazer problemas para o consumidor final ou produto. Após suceder-se o teste de Tukey, também se aplicou o teste de Bonferroni para maior garantia de controle de erro tipo I (chance de falso positivo), pois, este tem mais poder que o Tukey, é mais utilizado para testes em que há número pequeno de grupos devido ao nível de significância, este apresentou o mesmo resultado obtido pelo teste de Tukey.

8. CONCLUSÃO

O desenvolvimento desta pesquisa nos permite concluir que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, possui alto desempenho no processo de formação de biofilme em aço inoxidável AISI 304, assim como bactéria *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium, isso implica um problema para indústria de alimentos e outras áreas que utilizam o aço inoxidável para qualquer fim, se não houver a correta higienização do material utilizado, pode haver a formação do biofilme sobre a superfície, gerando prejuízos ao homem. Não se deve menosprezar o desempenho no processo de formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que também podem ocasionar danos a diversos segmentos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN IRON AND STEEL INSTITUTE - AISI. Southfield: **AISI**, 2008. Disponível em: <<http://www.steel.org>>. Acesso em: 17/12/2013.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 2008. 400 p

ARAÚJO, E. A.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, P. E.; SÁ, J. P. N. **Hidrofobicidade de ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios**. Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 491-497, jul./set. 2009.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. **Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(4): 886-895, out.-dez. 2009

BRIDIER, A.; DUBOIS-BRISSENET, F.; BOUBETRA, A.; THOMAS, V.; BRIANDET, R. **The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using high through put CLSM method**. J Microbiol Methods, v.82: p.64-70, 2010.

COSTERTON, J. **Introduction to biofilm**: Discussion, Int J Antimicrob Ag., 11, 217-221, 1999.

CRISTINA, A.G. **Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration**. Science. 1987; 237: 1588-95.

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

FRANCO, M. R.; CAIAFFA-FILHO H. H.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. **Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital**. Clinics (São Paulo) 2010, 65: 825-829.

FREITAS, V. R.; SAND, S. T. V. D.; SIMONETTI, A. B. **Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação**. Rev Odontol, Araraquara. Jul./ago., 2010; 39(4): 193-200

GIRARDELLO, Raquel. **ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE INFECÇÃO URINÁRIA**. 2007.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. **Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution**. International Journal of Food Microbiology, v. 130, pág. 77-87, 2009.

HAUN, Marcela Andréa Duran. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. 2004. 71p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HOOTON, S.; ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, I.F. **Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin**. International Journal of Food Microbiology. Amsterdam, v. 151, p.157-163, 2011.

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.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N.; NOGUEIRA, M.G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P.M.; CALL, J.E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J.B. **Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil**. International Journal of Food Microbiology. Amsterdam, v. 151, p.307-313, 2011

Li, B.; LOGAN, B. E. **Colloids and Surfaces B**. Biointerfaces 36.81-90, 2004

MANIJEH, M.; MOHAMED, J.; ROHA, K. K. **Biofilm formation by *Salmonella enteridis* on food contact surfaces**. Journal of Biological Sciences. 8(2): 502-505, 2008

MARQUES, S.C; REZENDE, J. G. O. S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. **Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers**. Brazilian journal of Microbiology (2007) 38:538-543 ISSN 1517-8382

MULLER, M.; SCHWARZ, P.; KICH, J.D.; CARDOSO, M. **Perfil sorológico e de isolamento de *Salmonella sp.* em suínos no início da terminação e ao abate.** Ciência Animal Brasileira. Goiânia, v. 10, p. 931-937, 2009.

PROAL, A. **Understanding Biofilms.** 2008. Disponível em: <http://bacteriality.com/2008/05/26/biofilm/> acesso: 23/03/2014.

REVOLLEDO, L. **Alternativas para o controle de *Salmonella*.** IX Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 2008. Chapecó (SC). Anais...Chapecó, 2008. p.95-110.

RONNER,A.B.; WONG, A. C. L. **Biofilm desenvolvimento and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber.** Journal of Food Protection, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

SANTOS, D. F. **Panorama nacional da segurança de alimentos.** São Paulo: Programa Alimentos Seguros, 2004. (Palestra)

SULE, P.; WADHAWAN, T.; CARR, N. J.; HORNE, S. M.; WOLFE, A. J.; PRÜB. **A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants .** Let. App. Microbiol., 2009.

TRAVAGIN, B. N. F. S. **Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios /** Bruna Nicolosi Franzini Silva Travagin. - - Piracicaba, 2010. 98 p . : il. Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

VOLF, J.; STEPANOVA, H.; MATIASOVIC, J.; KYROVA, K.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; LEVA, L.; FALDYNA, M.; RYCHLIK, I. ***Salmonella* entérica serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signaling in palatine tonsils.** Veterinary Microbiology. Amsterdam, v. 156, p.127-135, 2012.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. **Microbial evaluation of the biotransfer potencial form surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems.** Journal of Food Protection, v.59, n.7, p.727-733, july 1996.