



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
MESTRADO**

QUÊNIA GRAMILE SILVA MEIRA

**CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA A
SANITIZANTES DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE
SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO**

João Pessoa
2011

QUÊNIA GRAMILE SILVA MEIRA

**CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA A
SANITIZANTES DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE
SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO**

João Pessoa
2011

QUÊNIA GRAMILE SILVA MEIRA

**CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA A
SANITIZANTES DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE
SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

João Pessoa
2011

QUÊNIA GRAMILE SILVA MEIRA

**CAPACIDADE DE ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA A
SANITIZANTES DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE
SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

APROVADA EM: 31/03/2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr. Evandro Leite de Souza - Orientador

Departamento de Nutrição/CCS/UFPB

Prof.^a Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford – Examinador Interno

Departamento de Fisiologia e Patologia/CCS/UFPB

Prof.º Dr. Fábio Correia Sampaio – Examinador Externo

Departamento de Odontologia Clínica e Social/CCS/UFPB

Aos meus avós e minha mãe, Milton Camelo, Maria Oliveira (in memoriam) e Mivailda Camelo,

Que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a crescer e vencer

A André Luiz, meu esposo e cúmplice,

Minha fortaleza que sempre me incentiva e está ao meu lado em todos os momentos

Aos meus amigos,

Pela amizade, força e confiança.

Dedico

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, me segurando em suas mãos quando me senti frágil, e por ser tão bondoso comigo me iluminando cada vez mais para que eu possa chegar ainda mais longe, alcançando meus objetivos e ultrapassando as dificuldades,

A Ele meu maior agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, André Luiz, que me incentiva, me encoraja e me incita a ir sempre em frente de cabeça erguida, agradeço por esse imenso amor que me oferta, pela renúncia muitas vezes e por ser essa pessoa maravilhosa que Deus colocou em minha vida, meu porto seguro;

Aos meus avós, Milton Camelo e Maria Oliveira (*in memoriam*) e minha mãe Mivailda Camelo pelo amor, dedicação, apoio e incentivo e por tudo o que representam para mim e, à minha família, meus irmãos, padrasto, tios e primos, por sempre acreditarem que eu venceria na vida e nunca duvidarem da minha capacidade;

À minha sogra, Veralúcia Gomes, por me tratar como se eu fosse sua própria filha, por confiar em mim, pelo apoio dado, pelo carinho, enfim, por tudo;

Ao meu orientador, professor Dr. Evandro Leite de Souza, pela confiança, paciência e orientação a mim investidas, por me nortear e me instigar para que em nenhum momento eu fraquejasse e, ao contrário, pudesse seguir sempre mais forte;

Ao meu co-orientador, professor Dr. José Pinto de Siqueira Júnior, pelo apoio dado, por me receber no LGM de braços abertos, pela confiança e acima de tudo por ser meu amigo;

Aos meus amigos do mestrado, Rafaella Pordeus, Alana Moura, Bárbara Melo, Laura Liberalino, Mussara Monteiro, Fernanda Torres, Élide Rocha, Cléria Alvino, Talita Alves, Noádia Rodrigues, Eliseuda Marinho e Estevam Souza pela amizade, companheirismo e pelas lutas conjuntas no decorrer do programa de pós-graduação, a vocês, agradeço por tudo, principalmente pela amizade;

À minha amiga Taiz Siqueira, por ser tão amiga, irmã, cúmplice e até mesmo filha, por ser tão presente em minha vida, por me deixar participar de sua vida como alguém especial e me apoiar em todas as minhas decisões;

À minha amiga Mayara Queiroga, por ser essa pessoa tão maravilhosa, compreensiva, atenciosa, presente, alguém com quem sei que posso contar em qualquer momento;

À minha amiga Ianne Helena, pelo carinho, apoio, consideração, por ser tão amiga quanto ela poderia ser, por ser essa pessoa tão especial em minha vida;

À minha amiga Alessandra Danielle, pela amizade, pelo apoio, pelas alegrias, pelos momentos perfeitos na época da faculdade, pelo carinho, por ser tão "Alê";

À minha amiga Maísa Cunha, pelo carinho, pelo apoio, por acreditar em mim, pela amizade incondicional, pelas alegrias, pela confiança, enfim, por ser minha amiga de todas as horas;

À minha grande amiga, irmã mais velha e mais nova, Maísa Leal, obrigada por tudo o que representas para mim;

Às minhas super-amigas Michelly Amorim, Sonaya Kelly, Cristiana Santos, Malena Polyanna, Maria Aparecida, Ely Jardielly e Joana Resende por depositarem

em mim todo o carinho que eu poderia receber, por serem tão presentes mesmo na ausência, por estarem sempre de braços abertos para me receber, meninas, não tenho palavras para expressar a nossa amizade;

À minha amiga e comadre, Ana Clara Nunes, e ao meu amigo e compadre, Bruno Nunes, pela paciência em me escutar, pelo incentivo, por estar sempre presente mesmo tão longe, pelo carinho e acima de tudo por nossa verdadeira amizade;

Ao meu amigo Eduardo Vasconcelos, pelo carinho, pelo apoio, incentivo, paciência, a grande ajuda nos momentos difíceis, pelos “papos cabeça”, alegrias, enfim, por ser meu amigo Anjo que sempre me salva;

A minha amiga Elieidy Gomes, por toda paciência, pelo apoio, pela ajuda no meu trabalho, pelo incentivo, por ser tão carinhosa, tão amiga e tão solícita, ser assim, tão Elieidy, essa pessoa maravilhosa e agradável que cativa a todos que a cerca; muito obrigada por tudo;

A professora Dra. M^a da Conceição R. Gonçalves, pela oportunidade, incentivo e confiança a mim desprendidos;

A professora Dra. M^a Lúcia da Conceição, pelo apoio, por me ajudar sempre nos momentos em que precisei, pelas alegrias, pelo companheirismo, pelo grande incentivo, muito obrigada;

À banca examinadora composta pelos professores Dra. Thayza Stamford e Dr. Fábio Sampaio que se dispuseram a me avaliar na qualificação e defesa, adicionando conhecimento e minimizando as falhas do presente estudo, muito obrigada;

À minha amiga e bolsista do projeto, Isabella Medeiros, por estar sempre ao meu lado nas pesquisas, me ajudando, me ensinando, aprendendo, pela dedicação, responsabilidade e acima de tudo por sua amizade;

À minha amiga e voluntária Ana Júlia Athayde, por ser presente na pesquisa, pela força, dedicação, responsabilidade e pelo carinho, amizade, respeito e incentivos a mim ofertados;

Aos Secretários da Coordenação do Mestrado em Ciências da Nutrição, Sr. Carlos e Sr. Marcos, por serem sempre tão solícitos quando precisei;

Ao CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), especialmente à Prof^a Dra. Christina Peixoto, às técnicas Josy e Ceiza e ao Sr. Francisco pela presteza e solicitude quando da realização das atividades de microscopia eletrônica de varredura referentes à pesquisa;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos ao longo do curso de mestrado;

A todos aqueles que fizeram ou fazem parte da minha vida pessoal e acadêmica e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho que hoje se concretiza, ficam aqui os meus sinceros agradecimentos.

"Educação não transforma o mundo. Educação muda pessoas. Pessoas transformam o mundo".

Paulo Freire

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de adesão, a cinética de separação, a formação de biofilmes de cepas de *S. aureus* isoladas de diferentes Serviços de Alimentação e Nutrição da cidade de João Pessoa – PB, quando cultivadas em caldo substrato base carne e caldo substrato base vegetais, e incubadas em temperaturas de 28°C e 7°C por um tempo prolongado (24–72 h) além de avaliar o efeito da aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio (250 mg/L) e ácido peracético (30 mg/L) em inativar células bacterianas na matriz do biofilme previamente formado. Nestes experimentos foram utilizadas como superfícies-testes minissuperfícies (3 x 3 cm) de polipropileno e de aço inoxidável AISI 304, visto que tais materiais são amplamente utilizados na composição de superfícies, equipamentos e/ou utensílios utilizados nos variados tipos de serviços de alimentação. Os resultados mostraram uma alta capacidade de adesão das cepas avaliadas em caldo substrato base carne e em caldo substrato base vegetal com contagens superiores a 5 log UFC/cm², independente do tipo de superfície e a temperatura de incubação. O descolamento das células nas superfícies foi de pelo menos 10³ UFC/cm² durante os 6 primeiros contatos com o ágar para os dois tipos de substrato utilizados, caracterizando uma alta persistência durante um tempo prolongado de incubação (24 a 72h). Não foi encontrada uma clara influência em relação à superfície e a temperatura utilizada na avaliação da capacidade de adesão. Em geral, para os dois tipos de substratos utilizados foi demonstrado um padrão de formação de biofilme semelhante, ao final de 15 dias de incubação, quando as cepas foram submetidas às diferentes combinações de tipos de superfícies e temperaturas de crescimento. O número de células (10⁵ – 10⁷ UFC/cm²) necessários para a formação do biofilme foi observado em todos os sistemas experimentais já após 3 dias de incubação seguidos de uma redução linear após o 6º dia, com exceção da cepa S28 cultivada em caldo substrato base vegetais, que apresentou valores em torno de 10⁴ UFC/cm² nas primeiras 24h de incubação. Um intervalo de 2,6 – 3,7 log UFC/cm² para as cepas incubadas em caldo substrato base carne e de 2,0 – 3,3 log UFC/cm² para as cepas incubadas em caldo substrato base vegetal foi observado na redução das células na matriz do biofilme causado pelo ácido peracético enquanto que pelo hipoclorito de sódio a redução foi da ordem de 2,1 – 2,7 log UFC/cm² e de 1,5 – 2,1 UFC/cm² para cepas cultivadas em caldos substrato base carne e vegetais, respectivamente. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que as cepas testadas evidenciam uma elevada capacidade de adesão e formação de biofilme em superfícies de contato de alimentos quando expostas a diferentes meios de cultura e características ambientais. Além disso, os sanitizantes utilizados, apesar de reduzirem o número de células aderidas às superfícies, demonstraram ineficácia na remoção de células da matriz do biofilme tendo em vista o número de células viáveis encontradas após o processo de aplicação dos sanitizantes.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, biofilme, sanitizantes

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the ability of adhesion, the kinetics of separation, the pattern of biofilm formation of strains of *S. aureus* isolated from different Food and Nutrition Services from João Pessoa - PB, when cultured in meat-based broth and vegetable-based broth, and incubated at temperatures of 28°C and 7°C for an extended time (24–72 h). Still, we evaluated the effect of applying sanitizers sodium hypochlorite (250 mg/L) and peracetic acid (30 mg/L) at inactivating bacterial cells in the biofilm matrix formed previously. These experiments were used as coupons (2 x 2 cm) of polypropylene and stainless steel AISI 304, whereas these materials are widely used in the composition of surfaces, equipment and / or utensils used in various types of food services. The results showed a high adhesion capacity of the strains tested in meat-based broth and vegetable-based broth with counts above 5 log CFU/cm², regardless of surface type and incubation temperature. The detachment of cells on the surface was at least 10³ during the first 6 CFU/cm² contact with agar for both types of substrate used, featuring a high persistence over a prolonged incubation time (24 to 72h). There was not a clear influence from the surface and the temperature used to evaluate the adhesion. In general, for both types of substrate was shown a similar pattern of biofilm formation when strains were subjected to different combinations of surface types and growth temperatures. The number of cells (10⁵-10⁷ CFU/cm²) required for biofilm formation was observed in all experimental systems already after 3 days of incubation followed by a linear decrease after the 6th day, with the exception of strain S28 grown in vegetable-based broth, which showed values around 10⁴ CFU/cm² the first 24 hours of incubation. A range from 2.6 to 3.7 log CFU/cm² for strains incubated meat-based broth and 2.0 to 3.3 log CFU/cm² for strains incubated in vegetable-based broth was observed in reducing cells in the matrix of the biofilm caused by peracetic acid while the sodium hypochlorite reduction was about 2.1 to 2.7 log CFU/cm² and 1.5 to 2.1 CFU/cm² for strains grown in meat-based broth and vegetables, respectively. From the results obtained, it can be concluded that the strains tested showed a high capacity for adhesion and biofilm formation on food contact surfaces when exposed to different culture media and environmental characteristics. Furthermore, the sanitizers used, although reducing the number of adhered cells, demonstrate a certain ineffectiveness in removing cells from the biofilm matrix considering the number of remaining cells found after the process of applying sanitizers.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, biofilm, sanitizers

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Exemplo de ecologia de comunidades microbianas	36
Figura 2 – Esquema ilustrativo das fases da formação de um biofilme	39
Figura 3 – Mecanismo de resistência mediado por variações fenotípicas	40
Figura 4 – Reação de dissociação do hipoclorito de sódio em solução aquosa.	44
Figura 5 - Reação de formação do ácido peracético	44

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1 – Cinética de adesão das cepas S3, S28 e S54 em superfícies de polipropileno e aço inoxidável em caldo a base de carne a 7°C e 28°C.	87
Figura 2 – Cinética de separação das cepas S3, S28 e S54 após 24, 48 e 72 horas de incubação em superfícies de polipropileno e aço inoxidável em caldo a base de carne a 7°C e 28°C.	88
Figura 3 – Formação de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> S3 em superfícies de polipropileno e aço inoxidável em caldo a base de carne a 7°C e 28°C após 15 dias de incubação.	89
Figura 4 – Microfotografia eletrônica de células de <i>Staphylococcus aureus</i> S3 aderidas em polipropileno e aço inoxidável quando incubadas em caldo a base de carne a 7°C e 28°C por 15 dias após a aplicação de água (controle), ácido peracético e hipoclorito de sódio.	90

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1 – Cinética de adesão das cepas S3, S28 e S54 em superfícies de polipropileno e aço inoxidável em caldo a base de vegetais a 7°C e 28°C. 103

Figura 2 – Cinética de separação das cepas S3, S28 e S54 após 24, 48 e 72 horas de incubação em superfícies de polipropileno e aço inoxidável em caldo a base de vegetais a 7°C e 28°C. 104

Figura 3 – Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* S3 em superfícies de polipropileno e aço inoxidável em caldo a base de vegetais a 7°C e 28°C após 15 dias de incubação. 105

Figura 4 – Microfotografia eletrônica de células de *Staphylococcus aureus* S3 aderidas em polipropileno e aço inoxidável quando incubadas em caldo a base de vegetais a 7°C e 28°C por 15 dias após a aplicação de água (controle), ácido peracético e hipoclorito de sódio. 106

LISTA DE TABELAS
TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 – Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> .	24
Tabela 2 – Composição físico-química dos caldos à base de carne e vegetais.	48

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1 – Características físico-químicas do caldo à base de carne	85
Tabela 2 – Efeito da aplicação dos sanitizantes ácido peracético (30mg/L) e hipoclorito de sódio (250mg/L) na contagem (Log ufc/cm ²) de células de <i>S. aureus</i> S3 (crescimento em caldo a base de carne a 7 e 28°C) aderidas a superfícies de polipropileno e aço inoxidável.	86

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1 – Características físico-químicas do caldo à base de vegetais	101
Tabela 2 – Efeito da aplicação dos sanitizantes ácido peracético (30mg/L) e hipoclorito de sódio (250mg/L) na contagem (Log ufc/cm ²) de células de <i>S. aureus</i> S3 (crescimento em caldo a base de vegetais a 7 e 28°C) aderidas a superfícies de polipropileno e aço inoxidável.	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Atividade de água
AHL	N-acil homoserina lactona
AISI	American Iron and Steel Institute
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
BAP	Biofilm Associated Protein
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony-forming unit
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Exopolissacarídeos
ES	Enterotoxina estafilocócica (variações: A, B, C _{1,2,3} , D, E, G, I, J)
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PAA	Ácido peracético
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Adesina polissacarídica intercelular
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SE	Staphylococcal enterotoxin
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultra-violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Contaminação microbiana.....	19
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.3 Formação de Biofilmes: aspectos gerais.....	27
2.3.1 Fatores genéticos relacionados a formação de biofilme e <i>quorum Sensing</i>	33
2.3.2 Fases da formação do biofilme e resistência.....	37
2.4 Sanitizantes químicos.....	41
3 METODOLOGIA.....	46
3.1 Cepas teste.....	46
3.2 Superfícies teste.....	46
3.3 Elaboração de caldo base carne e caldo base vegetal.....	46
3.3.1 Análise da composição dos caldos base carne e vegetal.....	47
3.4 Condições experimentais.....	48
3.5 Avaliação da capacidade de adesão.....	49
3.6 Cinética de separação.....	49
3.7 Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	50
3.8 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre a matriz celular do biofilme.....	51
3.9 Procedimentos de microscopia eletrônica de varredura.....	52
3.10 Análises estatísticas.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ARTIGO 1.....	68
ARTIGO 2.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107

1 INTRODUÇÃO

Taxonomicamente os micro-organismos são organismos de dimensões microscópicas que possuem capacidade de viver na natureza na forma de células isoladas ou se organizando em comunidades. É extremamente difícil identificar a origem exata do conhecimento sobre a presença e o papel que desempenham os micro-organismos nos alimentos, de modo que as evidências disponíveis sugerem que esse conhecimento surgiu antes da consolidação da bacteriologia ou da microbiologia como ciência (JAY, 1994).

Atualmente, as superfícies que entram em contato com alimentos são de extrema importância como fonte de transmissão de micro-organismos patogênicos nos ambientes de produção de alimentos (BARNES, 1999). Sabe-se, que muitos micro-organismos patogênicos ou deteriorantes podem se encontrar aderidos às superfícies de alimentos ou nos ambientes de seu preparo.

Com o crescimento dos serviços de alimentação coletiva observa-se que os alimentos ficaram mais expostos a uma série de perigos ou oportunidades de contaminações microbianas associados a práticas incorretas de manipulação e processamento. A detecção e rápida correção das falhas no processamento dos alimentos, bem como a adoção de medidas preventivas, são a principal estratégia para o controle da qualidade dos alimentos (ALMEIDA; KUAYE; SERRANO; ALMEIDA, 1995).

Mais de 200 doenças podem ser causadas por alimentos contaminados por diversos agentes etiológicos e cerca de 30% dessas doenças estão associadas à matéria-prima, equipamentos e utensílios contaminados que estão, portanto, sujeitos à formação de processos de adesão microbiana (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008). De acordo com dados epidemiológicos disponíveis, as unidades de alimentação e nutrição são umas das maiores fontes de surtos de doenças veiculadas por alimentos (ANDRADE; SILVA; BRABES, 2003).

Segundo ANDRADE; PINTO; LIMA (2008) a ocorrência de surtos, no Brasil, é de notificação obrigatória desde 1999, conforme Portaria GM/MS nº 1461, de 22 de dezembro de 1999. No entanto, há subnotificações que geralmente ocorrem devido ao fato da doença poder se manifestar de forma branda e dos consumidores afetados não procurarem tratamento médico.

Staphylococcus aureus tem sido freqüentemente encontrado em superfícies de plantas de processamento de alimentos e reconhecido como sendo responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados em todo o mundo (MARQUES *et al.*, 2007; HERRERA, 2007). *S. aureus* é um dos mais importantes patógenos em seres humanos e animais (CUCARELLA *et al.*, 2001), e caracteriza-se por apresentar-se em cocos Gram-positivos, com reação de coagulase positiva, produzirem toxinas, crescerem satisfatoriamente em ambientes salinos com concentração de até 7,5% de NaCl (cloreto de sódio), e por serem freqüentemente encontrados na pele e nasofaringe de humanos.

Uma característica adicional de cepas de *S. aureus* que facilitam a sua sobrevivência e crescimento consiste na sua habilidade em formar biofilmes (DI POTO *et al.*, 2008). A capacidade de aderir e formar biofilmes por certas linhagens de micro-organismos, a exemplo de *S. aureus*, é reconhecido como uma vantagem fisiológica na sua possível atuação como agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos (HOOD; ZOTTOLA, 1995; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; STOODLEY *et al.*, 2002).

A maioria das bactérias, em seu *habitat*, vive em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a uma variedade de superfícies bióticas e, ou, abióticas, geralmente compondo o que se chama de biofilme (CAIXETA, 2008). Biofilmes são agregados celulares envoltos por uma matriz de exopolímeros que conferem às bactérias determinada capacidade de adaptação a condições desfavoráveis ao seu crescimento e/ou multiplicação (COSTERTON *et al.*, 1999). As bactérias que se encontram agregadas formando o biofilme possuem maior resistência à ação de sanitizantes ou outros agentes antimicrobianos quando comparadas às células dispersas no ambiente (SPOERING; LEWS, 2001; FUX *et al.*, 2004).

A adesão microbiana ocorre a partir de uma série de eventos sequenciais: deposição dos micro-organismos, afixação às superfícies, crescimento e estabelecimento do biofilme. Apesar de tais propriedades, a adesão e a formação do biofilme são limitadas por características do micro-organismo, do material aderente e do meio envolvendo o micro-organismo, tais como pH, temperatura, tempo de agitação e uma variedade de outros fatores (MARQUES, 2007; CAIXETA, 2008).

O envolvimento dos micro-organismos no processo de adesão e formação de biofilmes nas superfícies de equipamentos e utensílios para processamento de

alimentos ocorre em vários níveis de intensidade. A liberação desses micro-organismos pode trazer conseqüências indesejáveis à qualidade do alimento produzido, como a alteração de suas características nutricionais e organolépticas, além da possibilidade de atuarem na veiculação de micro-organismos patogênicos por meio da contaminação cruzada (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Todas as superfícies de processamento de alimentos são potenciais locais para a formação do biofilme, que pode ocorrer mesmo quando a higiene e os programas de sanitização são aplicados corretamente (CARPENTIER; CERF, 1993; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

A portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, aprova o “Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, definindo as condições técnicas para a utilização de materiais que compõem equipamentos e utensílios. De acordo com essa Portaria, todo o equipamento e o utensílio utilizado nos locais de manipulação de alimentos que possam entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que: I) não libere substâncias tóxicas, odores e sabores; II) seja não absorvente e resistente à corrosão e III) seja capaz de resistir a repetidas operações de limpeza e desinfecção.

Dentre os sanitizantes mais utilizados nos procedimentos de desinfecção e higienização de superfícies de processamento de alimentos, destaca-se o hipoclorito de sódio, porém a ação do ácido peracético pode ser mais vantajosa no que concerne ao baixo impacto ambiental e por ser mais efetivo contra os biofilmes, além de não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Para os serviços de alimentação, torna-se de fundamental importância identificar as condições sob as quais *S. aureus* é capaz de sobreviver e se multiplicar nos ambientes de processamento, armazenamento e distribuição de alimentos. Atualmente, há uma lacuna de informações acerca da capacidade/perfil de adesão e formação de biofilmes de cepas de *S. aureus* isoladas de superfícies de serviços de alimentação quando expostas a diferentes características ambientais, bem como de estudos com ênfase na observação da influência da aplicação de sanitizantes na sobrevivência e remoção destas bactérias da matriz do biofilme.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de adesão, a cinética de separação, a formação de biofilmes de cepas de *S. aureus* isoladas de

serviços de alimentação quando cultivadas em caldo substrato base carne e caldo substrato base vegetais e incubadas em diferentes temperaturas. Ainda, foi observado o efeito da aplicação de sanitizantes na redução da matriz celular do biofilme.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação microbiana

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), "a alimentação deve ser disponível em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar". Alimentos contaminados podem ser nocivos à saúde das pessoas que os consomem, provocando diversas enfermidades (MESQUITA *et al.*, 2006).

Os alimentos, independentemente de sua origem, apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial, embora suas regiões internas e profundas possam eventualmente apresentar formas microbianas viáveis (FAUSTINO *et al.*, 2007). A população microbiana em alimentos, ingredientes alimentares e do ambiente em contato com alimentos, constituem-se, normalmente, de muitas espécies diferentes provenientes de fontes diversas (RAY, 2004).

Na natureza e nos sistemas alimentares, os micro-organismos se depositam em superfícies sólidas e são dependentes de nutrientes, os quais devem ser suficientes para a sua viabilidade e crescimento. Esses micro-organismos são inicialmente depositados nas superfícies e, em seguida, são afixados, seguindo-se por seu crescimento e multiplicação ativa e formação de colônias de células (KUMAR; ANAND, 1998).

Entre as formas de vida dos micro-organismos (em suspensão – denominada planctônica; e agregada a superfícies – sésil ou em biofilme) observam-se peculiaridades que as diferem quanto à velocidade de crescimento; estrutura e composição da membrana celular; e sensibilidade a agentes antimicrobianos. Geralmente, a forma sésil apresenta alterações genéticas que possibilitam a inibição ou síntese de novas substâncias, além de uma estrutura protetora do grupo microbiano contra fatores ambientais agressivos. Assim, tais características proporcionam a estas células condições favoráveis de sobrevivência, o que as tornam menos susceptíveis à erradicação quando comparadas aos mesmos micro-organismos sob a forma planctônica (MORCK; OLSON; CERI, 2001).

Para as bactérias, o corpo humano é um conjunto de sítios ambientais que lhes proporcionam o calor, a umidade e os nutrientes necessários para o crescimento. Sendo assim, estes organismos têm adquirido características genéticas que lhes permitem invadir o ambiente, permanecerem em um sítio (aderindo ou colonizando), alcançarem o acesso às fontes de nutrientes (enzimas digestivas) e evitarem as respostas imunológicas e não imunológicas do organismo hospedeiro (MURRAY, ROSENTHAL, PFÜER, 2006).

Segundo dados publicados pelo CDC (*US Centers for Disease Control and Prevention*), alimentos contaminados causaram, somente nos Estados Unidos, aproximadamente 76 milhões casos de doenças originadas de alimentos, 325 mil hospitalizações e cinco mil mortes por ano (MEAD *et al.*, 1999). Em todo o mundo há uma preocupação em relação ao impacto das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) de origem microbiana sobre a condição de saúde dos indivíduos (WHITE *et al.*, 2002).

As DTA's de origem microbiana são de interesse da Vigilância Sanitária por diversos motivos, aos quais podem ser citados os diferentes micro-organismos envolvidos e toxinas pré-formadas, diversidade de produtos que podem veiculá-las, períodos de incubação variáveis, quadros clínicos diferenciados, além das conseqüências e seqüelas, às vezes, graves ao consumidor (FAUSTINO *et al.*, 2007).

As DTA's causadas por bactérias são prevalentes no Brasil e no mundo, podendo ocorrer sob a forma de surto ou individualmente. A contaminação de alimentos por bactérias representa um sério problema de segurança alimentar, visto que apenas pequeno percentual das ocorrências chega ao conhecimento das instituições que investigam estas doenças, o que prejudica a qualidade da informação epidemiológica (PERESI *et al.*, 2004).

Estima-se, que aproximadamente 30% dos habitantes de países industrializados sofrem de algum tipo de doença de origem microbiana transmitida por alimentos por ano, e que no século 21 pelo menos 2 milhões de pessoas morrerão em conseqüência de doenças diarréicas em todo o mundo. Uma razão específica envolvida no curso das causas da ocorrência das DTA's de origem microbiana consiste na possibilidade do estabelecimento da contaminação cruzada de alimentos por micro-organismos patogênicos envolvidos na formação de biofilmes ordenados em multicamadas e aderidos às diferentes superfícies dos ambientes de

serviços de alimentação (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; FUSTER-VALLS *et al.*, 2008).

A análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, juntamente com avaliações sanitárias e epidemiológicas, são ferramentas indispensáveis para elucidar a origem e as condições que possibilitaram a veiculação dos micro-organismos e seus produtos (MICHELIN; CARMO; CARLOS, 2006). Para Kawasaki; Cyrillo; Machado (2007) o segmento de refeições coletivas desempenha importante papel em termos de economia e saúde pública, na medida em que afeta o estado de saúde e o bem-estar da população por meio da qualidade do alimento que produz. Estes estabelecimentos de refeições coletivas são, em alguns casos, responsáveis por significativa parcela dos surtos de DTA's.

A contaminação microbiana de produtos alimentícios nos serviços de alimentação pode ocorrer através de diferentes rotas ambientais tais como o ar, manipuladores e superfícies (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Para Sousa (2008), vários fatores contribuem para os surtos de DTA's, de modo que os principais são:

- manipulação inadequada de alimentos;
- temperaturas inadequadas (falta de refrigeração adequada dos alimentos);
- cozimento inadequado;
- equipamento contaminado (falta de limpeza e desinfecção da cozinha ou de equipamentos das plantas de processamento de alimentos);
- higiene pessoal inadequada por parte dos manipuladores;
- preparo dos alimentos um dia ou mais antes de serem servidas associada ao reaquecimento impróprio;
- contaminação cruzada (dos produtos crus para produtos cozidos);
- adição de ingredientes contaminados com o alimento previamente cozido;
- permanência no pós-preparo em temperatura que permita o crescimento dos micro-organismos potencialmente perigosos ou a produção de toxinas nos alimentos.

Todos esses aspectos determinam contaminação em alimentos e caracterizam perigos iminentes para os indivíduos que os consomem.

A microbiota das mãos e do vestuário externo dos manipuladores de alimentos normalmente refletem o meio e os hábitos individuais. Os organismos envolvidos podem ser aqueles oriundos do solo, da água, do pó e de outras fontes do meio. Fontes importantes de contaminação são ainda as cavidades nasais, a boca, a pele e o trato gastrointestinal de humanos, os quais podem ser fontes de micro-organismos devido a práticas de higiene precárias (JAY, 2005).

Coelho *et al.* (2010) em estudo sobre a contaminação microbiológica de ambientes de restaurantes comerciais, avaliaram a presença de micro-organismos aeróbios mesófilos nas superfícies de bancadas, utensílios, equipamentos, mãos de manipuladores e ar. Estes pesquisadores constataram uma expressiva contaminação por bactérias aeróbias mesófilas nas amostras examinadas, excedendo os limites propostos pela APHA (*American Public Health Association*), o qual é 2 Ufc/cm². Estes micro-organismos foram detectados em 100% das amostras de ar, com contagem variando de $4,1 \times 10^1$ Ufc/cm²/semana a $1,1 \times 10^3$ Ufc/cm²/semana.

A rota de contaminação microbiana através de superfícies é reconhecida como de grande necessidade de controle nas atividades rotineiras dos serviços de alimentação, de modo que este controle pode ser alcançado através da implantação de um adequado programa de sanitização, o qual deve estar inserido em um conjunto mais amplo de procedimentos com vista à produção de alimentos seguros (VASSEUR *et al.*, 2001; VATOUR *et al.*, 2008).

Para não colocar em risco a saúde dos usuários, com a veiculação de micro-organismos patogênicos, deve-se controlar a contaminação, a multiplicação e a sobrevivência microbiana nos diversos ambientes, tais como equipamentos, utensílios e manipuladores, o que contribuirá para a obtenção de alimentos com satisfatória qualidade microbiológica (CAIXETA, 2008).

2.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococaceae*, juntamente como os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Bactérias do gênero *Staphylococcus* compreendem mais de 42 espécies registradas no banco de dados

Taxonomy Browser (NCBI, 2009), destas, cerca de 20 espécies estão associadas a infecções em humanos e animais. *S. aureus* apresenta-se como a espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, estando freqüentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos (SANTOS *et al.*, 2007).

S. aureus caracteriza-se como uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Apresenta temperatura ótima de crescimento em torno de 37°C e pH ótimo para crescimento de 6 - 7 (podendo crescer entre pH de 4 a 10). Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), sendo frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (RAY, 2004; SANTOS *et al.*, 2007).

Apesar de *S. aureus* ser reconhecido como um organismo mesófilo (temperatura ótima de crescimento em torno de 35°C) pode crescer em uma considerável margem de temperaturas. O micro-organismo é considerado por alguns autores como a eubactéria mais halotolerante não-halófila, crescendo a uma atividade de água (Aa) de 0,86; e com capacidade para desenvolver-se em ambientes com até 20% de cloreto de sódio (TATINI, 1973; GUTIERREZ *et al.*, 1995; MURRAY; ROSENTHAL; PFAÜER, 2006).

Os estafilococos são susceptíveis a altas temperaturas e a soluções desinfetantes e anti-sépticas, porém, podem sobreviver em superfícies secas por longos períodos, devido à camada espessa de peptidoglicano e à ausência de camada externa (MURRAY; ROSENTHAL; PFAÜER, 2006).

S. aureus tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares, como coagulase, lipase e termonuclease, que são considerados como fatores de virulência, sendo também empregados na diferenciação entre as outras espécies estafilocócicas (MADANI, 1998). A patogenicidade de uma cepa específica de *S. aureus* é atribuída ao efeito combinado de fatores extracelulares e toxinas, juntamente com propriedades invasivas, tais como aderência, formação de biofilme e resistência a fagocitose (CUCARELLA *et al.*, 2001). Infecções estafilocócicas típicas como endocardite, meningite, osteomielite, infecções de feridas pós-operatórias e

infecções pulmonares crônicas podem envolver diferentes conjuntos de fatores de virulência devido a diferentes condições ambientais (CRAMTON *et al.*, 2001).

Entre o gênero *Staphylococcus*, considera-se *S. aureus* como a espécie mais virulenta devido à sua grande variedade de fatores de virulência (GÖTZ, 2002). Na Tabela 1 são elencados os diversos fatores de virulência de *S. aureus*.

Tabela 1: Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*.

Fatores de virulência	Efeitos biológicos
<i>Componentes da estrutura</i>	
Cápsula	Inibe a quimiotaxia, fagocitose, proliferação das células mononucleares e facilita a aderência a corpos estranhos
Peptidoglicano	Produção de pirógenos endógenos; ação quimiotática de leucócitos; inibe a fagocitose
Ácido Teicóico	Regula a concentração catiônica da membrana celular e se une a fibronectina
Proteína A	Ação quimiotática de leucócitos, anticomplemento
Membrana citoplasmática	Barreira osmótica; regula o transporte para o interior e exterior da célula, localização de enzimas biossintéticas e respiratórias
Toxinas	
Citotoxinas	Tóxicas para: leucócitos, eritrócitos, macrófagos, plaquetas e fibroblastos
Toxinas esfoliativas (ETA, ETB)	Proteases séricas: quebram as pontes intercelulares da camada granulosa da epiderme
Enterotoxinas (A-E, G-I)	Estimulam a liberação de mediadores inflamatórios
Síndrome do Choque Tóxico (toxina-1)	Produz o extravasamento ou a destruição de células endoteliais
Enzimas	
Coagulase	Converte o fibrinogênio em fibrina
Catalase	Cataliza a conversão do peróxido de hidrogênio
Hialuronidase	Hidrolisa os ácidos hialurônicos no tecido conectivo, facilitando a disseminação dos estafilococos nos tecidos
Fibrinolisina	Dissolve os coágulos de fibrina
Lípases	Hidrolisa os lipídeos
Nucleases	Hidrolisa o DNA
Penicilase	Hidrolisa as penicilinas

Adaptado de Murray (2006)

Para Jay (2005) em temperaturas que favorecem o crescimento dos estafilococos, a biota saprofítica normal do alimento oferece proteção contra o crescimento estafilocócico por meio de antagonismo, competição por nutrientes e modificações das condições ambientais, tornando o ambiente menos propício para a sobrevivência de *S. aureus*. Desta forma, pode-se considerar tal micro-organismo como tendo características gerais de pobre competidor, porém com considerável risco de contaminação de alimentos após a destruição ou inibição da sua flora normal, como no caso de contaminação pós-cocção (RODE *et al.*, 2007).

S. aureus é reconhecido com um dos agentes patogênicos mais comuns, e como sendo responsável por surtos associados à ingestão de alimentos *in natura* e processados em todo o mundo. Em geral, pode-se esperar a presença de *S. aureus*, mesmo que em pequenas quantidades, em quase todos os alimentos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados, a não ser que tenham sido aplicados tratamentos térmicos para a destruição desses micro-organismos (BALABAN; RASOOLY, 2000; BRAGA *et al.*, 2005).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas, as quais são produzidas somente por algumas espécies e linhagens de estafilococos. Os alimentos comumente associados com intoxicação alimentar estafilocócica são carnes, produtos a base de carnes, saladas, produtos de padaria recheados e produtos lácteos. A intoxicação alimentar estafilocócica foi estudada pela primeira vez, em 1894, por J. Denys e depois em 1914, por M. A. Barber, que reproduziu em si mesmo os efeitos e sintomas da doença por meio do consumo de leite inoculado com uma cultura de *S. aureus* (MICHELIN; CARMO; CARLOS, 2006, JAY, 2005).

Os sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica usualmente iniciam-se 4 a 8 horas após a ingestão da enterotoxina presente no alimento (embora intervalos de 1 a 6 horas tenham sido relatados), apresentando um quadro de emese afebril aguda, cefaléia, sudorese, prostração, diarreia e náuseas, que geralmente tem duração de 24 a 48 horas.

As toxinas estafilocócicas, identificadas em 1998, formam uma família de 10 tipos sorológicos principais de enterotoxinas termo-estáveis (ESA, ESB, ESC₁, ESC₂, ESC₃, ESD, ESSE e, mais recentemente, ESG, ESIE e ESJ) que são responsáveis pelo chamado envenenamento alimentar estafilocócico. As enterotoxinas estafilocócicas caracterizam-se como proteínas imunologicamente

distintas, hidrossolúveis e resistentes à ação do calor. A quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar a doença em humanos é aproximadamente 0,015 e 0,375 µg de enterotoxina por quilo de massa corpórea. A síntese de SEA, SED e SEE ocorre na fase logarítmica de crescimento, enquanto que SEB e SEC são produzidas no final da fase estacionária (MICHELIN; CARMO; CARLOS, 2006; JAY, 2005; NOSTRO *et al.*, 2004; PEREIRA, 2006).

As toxinas variam em relação à estabilidade térmica, por exemplo, a SEB é mais estável que o SEA. Valores normais de temperatura e tempo utilizados para cozinhar ou processar alimentos não destroem o potencial das toxinas em causar a intoxicação estafilocócica. A taxa de produção de toxinas por uma cepa está diretamente relacionado à sua taxa de crescimento e concentração de células. Em condições ótimas de crescimento, as toxinas podem ser detectadas quando a população bacteriana chega a mais de alguns milhões por grama ou mililitro de alimento, e, geralmente, em cerca de 4h. Alguns dos mais baixos parâmetros ambientais para a produção de enterotoxinas estafilocócicas são 10°C, pH 5,0 e Aa 0,86 (RAY, 2004).

A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* é considerada como uma das mais freqüentes doenças transmitidas por alimentos em diversos países, tendo relatos que a cita como a terceira maior causa de envenenamento alimentar confirmado em todo o mundo (NOSTRO *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2005).

Michelin; Carmo; Carlos (2006) descreveram um surto de intoxicação alimentar estafilocócica ocorrido na cidade de Birigui – São Paulo em 1998, envolvendo aproximadamente 1800 pessoas, quando destas 1200 eram crianças em idade escolar. Os indivíduos alimentaram-se da merenda escolar composta por arroz, feijão e farofa (esta contendo farinha de milho, farinha de mandioca, ervilha, milho em conserva, lingüiça tipo toscana e mortadela), sendo encontradas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva superior a $8,5 \times 10^7$ Ufc/g, além da detecção de cepas produtora de enterotoxina tipo A nas amostras de farofa.

Peresi *et al.* (2004) relataram oito surtos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo *S. aureus* ocorridos na região de São José do Rio Preto – São Paulo, no período de Dezembro de 2001 a abril de 2003 onde os produtos alimentícios envolvidos nos surtos foram doces e salgados de confeitaria, acometendo um número total de 52 indivíduos, com sete hospitalizações.

Faz-se necessário ressaltar, que as infecções causadas por *S. aureus* podem conduzir a uma patologia de alta severidade para muitos órgãos e sistemas, muitas vezes com o seu tratamento dificultado pela ação de cepas com características de resistência a maioria, ou mesmo a totalidade dos antibióticos convencionais (BRAGA et al, 2005).

Rapini *et al.* (2004) avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de queijo, e verificaram um elevado percentual de resistência múltipla das cepas a antimicrobianos como vancomicina, penicilina, gentamicina e tetraciclina.

Peresi *et al.* (2006) avaliaram a susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar ocorridos no noroeste do Estado de São Paulo de abril de 1990 a dezembro de 2003. Os pesquisadores verificaram que das 25 cepas de *S. aureus* envolvidas nos surtos, oito delas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados; quatro resistentes a um antimicrobiano; dez resistentes a dois; duas resistentes a três antimicrobianos e uma a quatro tipos de antimicrobiano. Os maiores percentuais de resistência foram frente à penicilina (56%), azitromicina e tetraciclina (20%), seguido de oxacilina (16%) e cloranfenicol (12%).

Pode-se inferir que o estabelecimento da maioria das doenças causadas por *S. aureus*, incluindo a intoxicação alimentar estafilocócica, depende da habilidade da cepa de sobreviver no substrato colonizado, multiplicar-se sob uma variedade de condições e produzir várias substâncias extracelulares (PASTORIZA *et al.*, 2002).

2.3 Formação de Biofilmes: aspectos gerais

Nos ambientes naturais, as bactérias não existem apenas como células isoladas, mas crescem e sobrevivem em comunidades organizadas, podendo formar agregados celulares em suspensão ou até películas em superfícies líquidas. As comunidades microbianas que se desenvolvem na fase de interfaces, como sólido-líquido ou interfaces ar-líquido, são chamadas de biofilmes (JENKINSON; LAPPIN-SCOTT, 2001).

A definição mais aceita de biofilmes microbianos, que permite a sua diferenciação de células planctônicas, e que inclui todas as formas de vida microbiana com característica de biofilme, é a seguinte: “biofilmes são comunidades

de micro-organismos, aderidas a superfícies ou suspensas em solução, cujas células apresentam-se envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes” (COSTERTON *et al.*, 1999).

As primeiras observações de biofilmes foram realizadas por Antoine Van Leeuwenhoek que, observando amostras de seus próprios dentes, em um microscópio primitivo, notou fragmentos de células agregadas em maior quantidade que as células planctônicas que ali se encontravam. A primeira descrição detalhada de aderência microbiana em superfícies foi feita por Zobell em 1943, onde em um experimento com suspensão celular em uma garrafa de vidro, observou, pela primeira vez, que as bactérias localizavam-se em maior número na superfície interna da garrafa do que no líquido dentro dela. Porém, somente em 1970 a palavra biofilme foi introduzida na literatura científica (SHI; ZHU, 2009; PIZZOLITTO; PIZZOLITTO; POZETTI, 2001; COSTERTON; WILSON, 2004; ZOBELL, 1943).

Nos anos 1980, os biofilmes, em razão de representarem problemas que não podiam ser compreendidos utilizando o conceito de bactéria predominantemente planctônica, foram estudados utilizando técnicas laboratoriais desenvolvidas para o estudo de organismos individuais flutuantes. (COSTERTON; WILSON, 2004).

Descobertas notáveis ocorreram na investigação dos biofilmes durante esta última década. A aplicação de novas tecnologias microscópicas e moleculares para investigações de biofilmes demonstraram um sistema biológico com destacável nível de organização, onde as bactérias apresentam-se em comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

Os micro-organismos, especialmente, os procariontes, formam associações com outros micro-organismos e, assim, ganham não apenas a proteção de consequências danosas da ação do oxigênio (nos processos aeróbios e anaeróbios), especialmente de suas formas ativas, como também de outros fatores ambientais deletérios. Esta é uma das razões para o fato de que os micro-organismos existentes na natureza organizam-se principalmente na forma de comunidades estruturadas (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007).

Estudos sobre a estrutura do biofilme o têm revelado como sendo constituído principalmente por células microbianas e exopolissacarídeos (EPS), representando entre 50 e 90% do seu carbono orgânico total, sendo assim considerado o seu principal material de formação. Apesar do EPS variar em suas

propriedades físicas e químicas, já é bem estabelecido que sua principal constituição se dá por polissacarídeos. Uma característica importante é a propriedade aniônica da matriz de EPS conferida pela presença de ácidos urônicos (D-glucurônico, ácido D-galacturônico e manurônico) (OLIVEIRA; CUNHA, 2008).

Segundo Branda *et al.* (2005) o fato de as bactérias produzirem polissacarídeos extracelulares tem sido reconhecido há décadas, principalmente devido ao reconhecimento destes polímeros como tendo impacto sobre a virulência bacteriana. De acordo com Sutherland (2001), a composição e estrutura dos polissacarídeos determinam a sua configuração primária, como é o caso de muitos EPS bacterianos, que possuem estruturas de suporte principal que contêm resíduos 1,3- β ou 1,4- β -hexose, e tendem a ser mais rígidas e, em certos casos, pouco solúveis ou insolúveis em água.

Tolker-Nielsen; Molin (2000) mostraram que os biofilmes contêm microcolônias de células bacterianas encerradas em matriz de EPS e que estas estruturas são separadas por espaços vazios intersticiais (canais de água). Os canais de água são importantes para a circulação de fluido, permitindo assim o fluxo de nutrientes, oxigênio e micro-organismos de um local para outro. Mesmo os biofilmes em cultura pura, como os encontrados em superfícies de instrumentos ou associada com dispositivos médicos são heterogêneos.

A matriz de exopolímeros do biofilme pode agir como uma barreira de difusão de agentes antimicrobianos, como retentor molecular e/ou como material adsorvente. A resistência antimicrobiana exibida pelos biofilmes também se relaciona a sua estrutura tridimensional, visto que a característica de resistência tende a ser perdida quando esta organização estrutural é rompida (BUCKINGHAM-MEYER *et al.*, 2007).

Além da matriz de exopolissacarídeos, um biofilme também contém variadas partículas, como proteínas, lipídeos e outros tipos de carboidratos. Na grande maioria, estas moléculas são provenientes da fase aquosa e, desta forma, quanto mais rica esta for, maior será a quantidade e a variedade desses componentes em um biofilme (BOARI, 2008).

Segundo Caixeta (2008) a presença de poros no interior do biofilme desempenham variadas funções, entre elas: o transporte facilitado com difusão passiva ou com o auxílio de água, o qual ocorre através de capilaridade especial, em que o transporte de moléculas no interior do biofilme e a perda celular são

secretados através desses canais e o transporte de oxigênio no interior do biofilme. Sabe-se, portanto, que mesmo com esta função dos canais de água, ocorre uma limitação da difusão do oxigênio paralela a uma demanda de consumo no biofilme, resultando no baixo conteúdo de oxigênio no seu interior.

Para Nikolaev; Plakunov (2007) de acordo com a sua definição, os biofilmes são comunidades microbianas que são formadas nos limites de interfase. Existem quatro tipos conhecidos de limites de interfase em que as associações microbianas desenvolvem-se, a saber: a) líquido-líquido; b) líquido-sólido; c) ar-líquido e d) ar-sólido. Portanto, pode-se prever que quatro tipos de biofilmes podem ser encontrados, embora até o presente os biofilmes em desenvolvimento na fronteira de meios líquidos e sólidos tenham sido investigados em detalhe.

Segundo Xavier *et al.* (2005) os biofilmes têm importância em várias atividades humanas. Estações de tratamento de águas ou de afluentes removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica na água ou afluente através de interação com biofilmes, bem como numerosos bioprocessos também utilizam biofilmes, tais como: produção de vinagre, produção de ácido cítrico e processos biológicos para a extração de metais. Em contrapartida, o crescimento do biofilme pode não ser desejado, tendo em vista alguns impactos negativos que podem causar, a citar: biocorrosão de equipamentos, contaminação de produtos (alimentos ou equipamentos), perdas energéticas relacionadas ao aumento do atrito, resistência acrescida à transferência de calor, entre outros efeitos deletérios.

Um biofilme pode ser mono-espécie quando sua formação diz respeito a apenas um tipo de micro-organismo, ou multi-espécies, quando é encontrada mais que uma espécie na comunidade (BOARI, 2008). Segundo O'Toole *et al.* (2000) os biofilmes mono-espécie ocorrem com maior frequência em tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, como consequência de processos infecciosos. Em se tratando de outras superfícies, como aquela empregada em organizações do ramo alimentício, destacada atenção deve ser dada a biofilmes multi-espécies.

Embora a maioria dos estudos descreva as bactérias Gram-negativas como as principais formadoras de biofilme, sabe-se que as bactérias Gram-positivas também estão presentes na estrutura do biofilme (MCBAIN *et al.*, 2003).

A diferenciação entre o que seja adesão e o que seja biofilme tem sido proposta em função da quantidade de células presentes por cm². Segundo Andrade *et al.* (1998) é necessário um número mínimo de 10⁷ células aderidas por cm²,

enquanto, para Ronner; Wong (1993) e Wirtanen; Ahola; Mattila-Sandholm (1996) se considera como biofilme um número de células aderidas de 10^3 e 10^5 por cm^2 .

Como etapas importantes para a sua formação são descritas as bioadesões iniciais, passando o micro-organismo de seu estilo de vida planctônico ao sésil; a formação de microcolônias; a maturação do biofilme; e o destacamento de células, retornando a seu estilo de vida planctônico. Em todas essas fases, ocorre uma série de transformações intrínsecas ao micro-organismo e na sua relação com os demais micro-organismos que compõem o biofilme (BOARI, 2008).

A formação de biofilme em superfícies de polímeros é um processo complexo que depende de características da superfície das bactérias, da natureza do material e de fatores ambientais como a composição do meio (BAILLIF et al, 2008). O processo de formação de biofilmes bacterianos em superfícies sólidas se dá inicialmente pela adesão dos micro-organismos colonizadores iniciais ao substrato (superfície), de modo que a subpopulação aderida capaz de produzir biomassa a partir dos nutrientes disponíveis inicia a produção do biofilme através da proliferação das células e da produção e excreção dos componentes da matriz de exopolímeros (MACK et al., 2004).

Diferenças na densidade em todo o biofilme bacteriano determinam os gradientes de nutrientes e disponibilidade de oxigênio dentro da estrutura. Como consequência, as bactérias localizadas na periferia têm melhor acesso aos nutrientes e ao oxigênio do que as àquelas localizadas mais internamente ao biofilme. Essas diferenças na disponibilidade de nutrientes e oxigênio resultam em diferenças na atividade metabólica entre as bactérias, levando a heterogeneidade da população (DRENKARD, 2003).

Para Stoodley et al. (2002) e Latasa et al. (2006), muitas alterações fenotípicas são percebidas entre os micro-organismos que compõem o biofilme, principalmente no que concerne à motilidade, tamanho celular e metabolismo que decorrem da restrição de nutrientes e de oxigênio em algumas fases, salientando também a variação na taxa de reprodução e em toda a regulação gênica. Segundo Jonhson (2007), todas estas adaptações, determinadas por condições físicas, bioquímicas e genéticas são uma interessante estratégia de sobrevivência.

As bactérias são os micro-organismos mais estudados com respeito à colonização de superfícies, e subsequente formação de biofilme, embora fungos, leveduras, algas, protozoários e vírus também tenham sido encontrados em

biofilmes de ambientes industriais e na área da saúde (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

Alguns pesquisadores discutem que uma das características mais importantes de um biofilme bacteriano é a sua resistência a agentes antimicrobianos e componentes do sistema imunológico do hospedeiro. Como consequência, as doenças que envolvem biofilmes são geralmente crônicas e de difícil tratamento. As bactérias que vivem em biofilmes podem alcançar um número aproximado a quinhentas ou até 1000 vezes mais resistentes à compostos antibacterianos do que bactérias planctônicas, indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos podem diferir dos mecanismos responsáveis pela resistência antimicrobiana em bactérias planctônicas (DRENKARD, 2003; COSTERTON *et al.*, 1995).

Os agregados celulares liberados dos biofilmes retêm sua elevada capacidade de resistência a agentes antimicrobianos, e pode conter suficiente número de bactérias para representar uma potencial dose infectiva. Desta forma, assume-se a formação do biofilme como um potencial risco a saúde do consumidor, particularmente, se a contaminação do alimento ocorre após uma operação ou tratamento bactericida (SPOERING; LEWS, 2001; FUX; WILSON; STOODLEY, 2004).

Fatores como a fase de crescimento do micro-organismo, o tipo e propriedades do material inerte (superfície), a presença (e o tipo) de materiais orgânicos, as características do meio de crescimento, além do pH e temperatura ambiental podem ter influência sobre a capacidade de adesão microbiana sobre variadas superfícies (DONLAN; COSTERTON, 2002). Entretanto, existem poucas informações sobre o efeito destes fatores sobre a capacidade de adesão de micro-organismos patogênicos a superfícies utilizadas na produção de alimentos.

Diante disso, a formação de biofilmes microbianos sobre superfícies de plantas de processamento de alimentos deve ser levada em consideração quando forem planejados os métodos adequados para a aplicação na sua limpeza e desinfecção (MURGA *et al.*, 2001).

Pesquisas de caráter relevante, publicadas recentemente na literatura indexada, demonstram a importância da formação de biofilmes por algumas espécies como: *S. aureus* (FURUKAWA *et al.*, 2010; CABO *et al.*, 2009; OLIVEIRA; CUNHA, 2008; OULAHAL *et al.*, 2008; HERRERA *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*,

2007; HARRIS; RICHARDS, 2003; BELKUM; SIJMONS, VERBRUGH, 2002;), *Staphylococcus xylosus* (PLANCHON *et al.*, 2006), *Pseudomonas fluorescens* (SIMÕES *et al.*, 2006;), *P. aeruginosa* (DRENKARD, 2003; SPOERING; LEWIS, 2001), *Escherichia coli* (LOMANDER *et al.*, 2004), *Listeria monocytogenes* (RIEU *et al.*, 2008;), *L. innocua* (OULAHAL *et al.*, 2008) *Salmonella spp.* (KARUNASAGAR, 2000), *Streptococcus mutans* (ARTHUR *et al.*, 2007).

Algumas das superfícies sólidas empregadas para o estudo do perfil de formação de biofilmes por parte de bactérias de interesse em alimentos incluem selantes para pisos, placas de vidro, náilon, policarbonato, polipropileno, borracha, aço inoxidável e *Teflon*[®], destacando-se vidro e aço inoxidável do tipo AISI 304 (*American Iron and Steel Institute*) (JOSEPH; OTTAS; KARANUSAGAR, 1998; GÂNDARA; OLIVEIRA, 2000; POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; JAY, 2005; ROSSONI; GAYLARDE, 2000; BOARI, 2008;).

Embora alguns estudos tenham observado a capacidade de adesão e formação de biofilmes por parte de cepas de *Staphylococcus* (HUSSAIN *et al.*, 2001; KUŽMAN *et al.*, 2007), nota-se que a maioria destes estudos tem sido voltada para a consideração de repercussões clínicas relacionados à formação de biofilmes em implantes e materiais médicos. Ainda, estes estudos têm utilizado *S. epidermidis* como organismo modelo para o gênero *Staphylococcus* (RODE *et al.*, 2007). Até recentemente, e em contraste com *S. epidermidis*, muito pouco tem sido conhecido sobre a habilidade de *S. aureus* de apresentar-se embebido em uma matriz polimérica e de crescer em uma arquitetura complexa de biofilme (CRAMTON *et al.*, 2001; MACK *et al.*, 2004).

2.3.1 Fatores genéticos relacionados a formação de biofilme e *quorum sensing*

A proximidade de células no interior do biofilme ou entre microcolônias oferece um excelente ambiente para o intercâmbio de material genético. O mecanismo de conjugação, ou seja, a transferência de plasmídeos entre bactérias, ocorre em maior proporção nas células do biofilme bacteriano que entre células planctônicas (OLIVEIRA; CUNHA, 2008).

Ghigo (2001) sugeriu que as cepas clinicamente relevantes de bactérias contendo plasmídeos conjuntivos desenvolvem biofilmes mais fidedignamente. O autor mostrou que o pilus F conjugativo (codificado pelo operon TRA do plasmídeo

F) em *E. coli* atua como um fator de adesão em célula-superfície e de interações célula a célula, resultando em um biofilme tridimensional. Cepas de *E. coli* que não carregavam plasmídeos produziram apenas microcolônias, entretanto quando receberam o plasmídeo da bactéria doadora passaram a produzir o biofilme.

Os plasmídeos também podem codificar a resistência a vários agentes antimicrobianos, os quais nesta associação com o biofilme acabam por fornecer um mecanismo de seleção e de disseminação da resistência aos antimicrobianos.

Camadas de bactérias são formadas no biofilme pela ligação das células entre si através da adesina polissacarídica intercelular (PIA), uma molécula de polissacarídeo que favorece a adesão entre as células, e através de uma proteína extracelular chamada proteína associada à acumulação (OLIVEIRA; CUNHA, 2008).

PIA é um homopolímero linear de até 130 resíduos de β -1,6 N-acetilglicosamina, constituído por duas frações polissacarídicas: polissacarídeo I (>80%), que contém 15 a 20% de resíduos diacetilados e, portanto, positivamente carregada; e polissacarídeos II (<20%), que está estruturalmente relacionado com polissacarídeo, mas que contém um número menor de resíduos D-glucosamina não-N-acetilados, fosfato e succinato éster-ligados, (ARCIOLA; BALDASSARRI; MONTANARO, 2001; GÖTZ, 2002).

A expressão do operon *ica* tem sido associada com a formação de biofilmes por *S. aureus*, porém a aumentada transcrição deste operon não necessariamente se correlaciona com uma aumentada capacidade de formação de biofilme, suscitando a evidência da existência de mecanismos independentes do operon *ica* relacionados à formação de biofilmes por este micro-organismo (MACK *et al.*, 2004; RODE *et al.*, 2007).

Os genes que codificam as mais importantes substâncias e proteínas, especialmente as adesinas polissacarídicas que participam na formação de biofilme, pertencem ao operon *ica*. Este operon contém os genes *icaADBC* e o gene regulador *icaR* que é transcrito na direção oposta ao operon *ica*. Em resumo, a síntese da cápsula de polissacarídeo é mediada pelo operon *ica*. A expressão do gene *icaA* isoladamente induz apenas a baixa atividade enzimática, enquanto a co-expressão de *icaA* e *icaD* conduz ao aumento significativo na atividade da N-acetilglicosamina transferase, que catalisa a formação de oligômeros com cerca de 20 resíduos. A expressão do gene *icaC* leva à síntese de grandes oligômeros (130 resíduos) que reagem com PIA soro-específicas. A função do gene *icaB* ainda não

tem sido estabelecida. (ARCIOLA; BALDASSARRI; MONTANARO, 2001; CAFISO *et al.*, 2004; CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002; CRAMTON *et al.*, 2001)

Recentemente, foi encontrado que *S. aureus* contém o gene *icaADBC* que confere a capacidade de produção de adesinas polissacarídicas intercelulares (PIA – *Polysaccharides Intercellular Adesins*) (CUCARELLA *et al.*, 2004; VAUTOR *et al.*, 2008). Há evidências que sugerem que células de *S. aureus* em biofilmes mostram modificações metabólicas e regulatórias correlacionadas com alterações fenotípicas sumarizadas como variantes de fenótipo de colônias. Estas variantes de colônias apresentam um padrão de expressão de genes diferente daquele de células planctônicas (CHUARD *et al.*, 1997; COSTERTON *et al.*, 1999). PIA é codificada pelo operon *ica*, compreendendo o gene *icaADBC*.

Um novo gene (6831 nucleotídeos) envolvido na formação de biofilmes (*bap* – codificador para a proteína associada a biofilme - *biofilm-associated protein*) foi identificado em uma pequena proporção de cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Esta proteína confere capacidade à bactéria de formar o biofilme, bem como exerce importante papel no desenvolvimento de processos infecciosos (CUCARELLA *et al.*, 2001).

Um dos mecanismos de comunicação interbacteriana que já demonstrou ser extremamente importante para a formação e desenvolvimento de biofilmes é o *quorum sensing* (DAVEY; O'TOOLE, 2000), um sistema pelo qual as bactérias se comunicam entre si através de moléculas sinalizadoras, chamadas autoindutores (sua recepção e interpretação), que regulam o comportamento de bactérias de acordo com a densidade populacional (OLIVEIRA; CUNHA, 2008).

O estabelecimento de um comportamento multicelular é necessário para a formação de um biofilme constituído por uma ou várias espécies, que se reflete em ações coordenadas de interação e comunicação entre os vários organismos (DAVEY; O'TOOLE, 2000) (Figura 1).

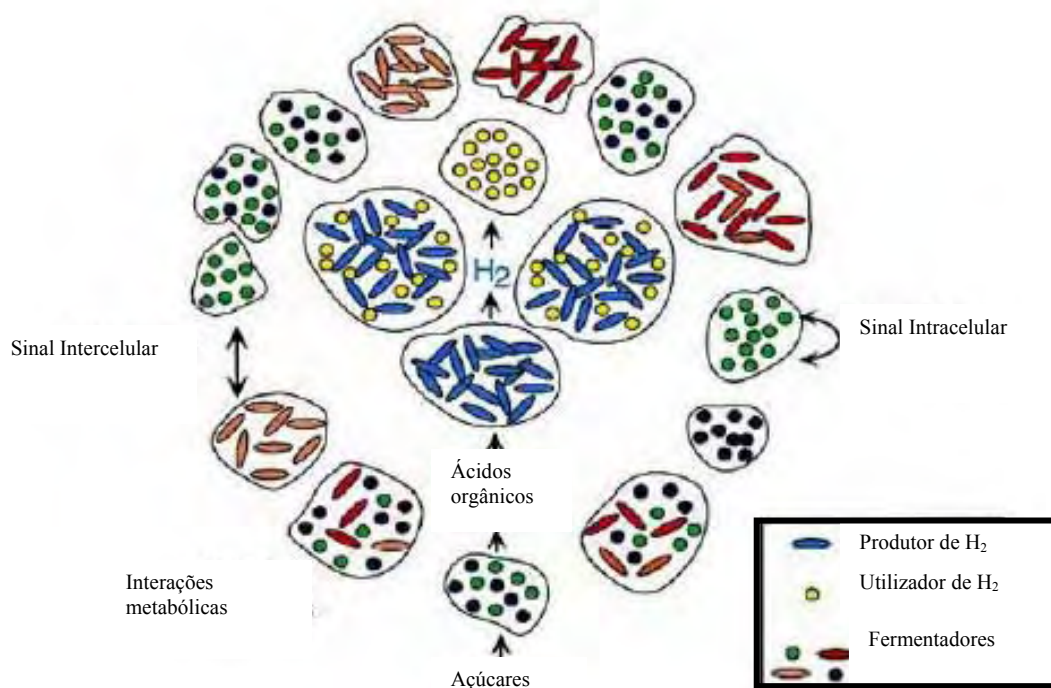


Figura 1 - Exemplo de ecologia de comunidades microbianas. As quatro microcolônias centrais correspondem aos organismos que geram e consomem o hidrogênio. Os fermentadores usam açúcares e produzem ácidos orgânicos que são utilizados pelos produtores de hidrogênio. Em adição às interações metabólicas, a comunicação intra e intercelular pode ser mediada por moléculas de sinalização. Adaptado de Davey; O'Toole (2000).

O *quorum sensing* bacteriano é um fenômeno comum que favorece o acesso a nutrientes ou a sítios ambientais mais favoráveis; permite que as bactérias organizem respostas defensivas contra hospedeiros eucarióticos; além de otimizar a capacidade das bactérias de se diferenciar em formas mais adaptadas à sobrevivência em ambientes hostis, onde as condições de crescimento são restritivas (VIANA, 2006).

Em bactérias Gram-negativas, um grande número de sistemas de *quorum sensing* apresenta moléculas derivadas da N-acil homoserina lactona (AHL) como sinais, ou autoindutores (Ais), que ativam proteínas reguladoras transcricionais (LuxI – AHL-sintetase, que atua como uma enzima - e LuxR – que se liga a AHL formando o complexo AHL-LuxR para ativar múltiplos genes). Em contraste, sistemas *quorum sensing* em bactérias Gram-positivas normalmente usam peptídeos secretados (muitas vezes referidos como feromônios) como moléculas de sinalização, e um sistema de dois componentes de regulação (composto por uma histidina ligada à membrana quinase e um regulador de resposta intracelular) para detectar o peptídeo, seguindo-se pelo desencadeamento de mudanças necessárias na expressão gênica (RAMEY *et al.*, 2004; SUNTHARALINGAM; CVITKOVITCH, 2005; TUROVSKIY *et al.*, 2007; BOARI, 2008).

Há o entendimento que o *quorum sensing* evoluiu devido a o fato de permitir às bactérias coordenarem o comportamento do grupo e comportarem-se como organismos multicelulares. Os sinais moleculares regulam genes específicos que caracterizam este comportamento e propiciam, dessa maneira, a exploração do ambiente de maneira mais eficiente do que seria possível a células individuais (VIANA, 2006).

2.3.2 Fases da formação do biofilme e resistência

O estudo da adesão da bactéria à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas das duas superfícies – bactéria e substrato – e da interação entre elas. Em geral, ambas as superfícies possuem carga global negativa, e para que ocorra a adesão é necessário que a barreira de repulsão eletrostática seja superada pela força atrativa (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Segundo Walker; Marsh (2004; 2007) a adesão inicial da bactéria com a superfície pode ser descrita usando a teoria DLVO, proposta por Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948) que sustenta que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Lifshitz-van der Waals e as forças de dupla camada elétrica. Para estes autores, a célula bacteriana penetra no limite da camada hidrodinâmica e experimenta um espaço de atração não específica global de cerca de 10-20 nm a partir da superfície.

Este espaço existe devido às interações pelas forças eletrostáticas de atração e repulsão de Van der Waals que atuam em toda a célula e são de longo alcance, fracas e reversíveis. Se a célula e a superfície forem predominantemente carregadas negativamente, as forças de repulsão aumentam e evitam que as células e a superfície entrem em contato mais estreitamente. Por outro lado, a ligação da célula pode vir a ser irreversível devido às interações estereoquímicas de curto alcance entre as adesinas nos micro-organismos e receptores complementares nas superfícies (WALKER; MARSH, 2007).

Para Andrade; Pinto; Lima (2008) a dinâmica biológica, química e física do desenvolvimento do biofilme, normalmente segue uma sequência temporal ordenada envolvendo várias fases. Sendo assim, a partir dos eventos supracitados, a formação do biofilme se dá pelas seguintes etapas:

1) Eventos pré-adesão: os micro-organismos, em seu estilo de vida planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir em alguma superfície (BOARI, 2008). Embora este processo necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influencia já são descritos, como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, auto-indutores do *quorum sensing* (interação célula-célula), presença de compostos inorgânicos e temperatura (OULAHAL *et al.*, 2008). Estes eventos iniciais são a chave de todo o processo de formação de biofilme e sua observação é extremamente complexa, em função de seu dinamismo (JOHNSON, 2008).

2) Adesão reversível: Segundo Oulahal (2008) é quando ocorre a interação célula-superfície e o início de sua colonização. Neste período ainda não se observam alterações fenotípicas quando comparadas às células planctônicas, por isso esta adesão é denominada reversível (DAVIES; GEESY, 1995; SAUER *et al.*, 2002). Segundo Davies; Geesy (1995) os genes para a produção de exopolissacarídeos são ativados após 15 minutos de contato entre célula e superfície.

3) Adesão irreversível: estabelece-se em um período de 2 horas após o início da adesão, e ocorre pela presença de *clusters* (microcolônias), caracterizando-se por células aderidas entre si e a uma superfície (BOARI, 2008). Ocorre neste estágio a produção de exopolissacarídeos formado principalmente pelos seguintes constituintes típicos: glucose, manose, frutose, ramnose, N-acetilglicosamina, ácido glicurônico entre outros (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

4) Maturação: ocorre de três a seis dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias, por meio do aumento da densidade populacional e, também, pela pronunciada produção e deposição de EPS, aumentando a espessura do biofilme (CHENG *et al.*, 2007; HEYDORN *et al.*, 2000). Ao final desta fase, observa-se uma estrutura dinâmica, com aproximadamente 100 µm, contendo canais de distribuição, microcolônias e bactérias móveis (SAUER *et al.*, 2002).

5) Destacamento de células: ocorre entre 9 a 12 dias após o início das fases. Segundo Sauer *et al.* (2002) as células são móveis e seu perfil morfofisiológico e de transcrição genética volta a se assemelhar àquele das células planctônicas. Porém, para Boari (2008) este evento ainda necessita de maiores elucidações.

Segundo Caixeta (2008) existem várias propostas para explicar o desprendimento de células do biofilme, de modo que tais processos envolvem a

separação ativa pela clivagem através da ação de enzimas de polímeros da matriz ou ainda por mudanças na fisiologia de células aderidas.

Na Figura 2 é apresentado um esquema ilustrativo das fases da formação de um biofilme, adaptado de Jenkinson; Lappin-Scott (2001):

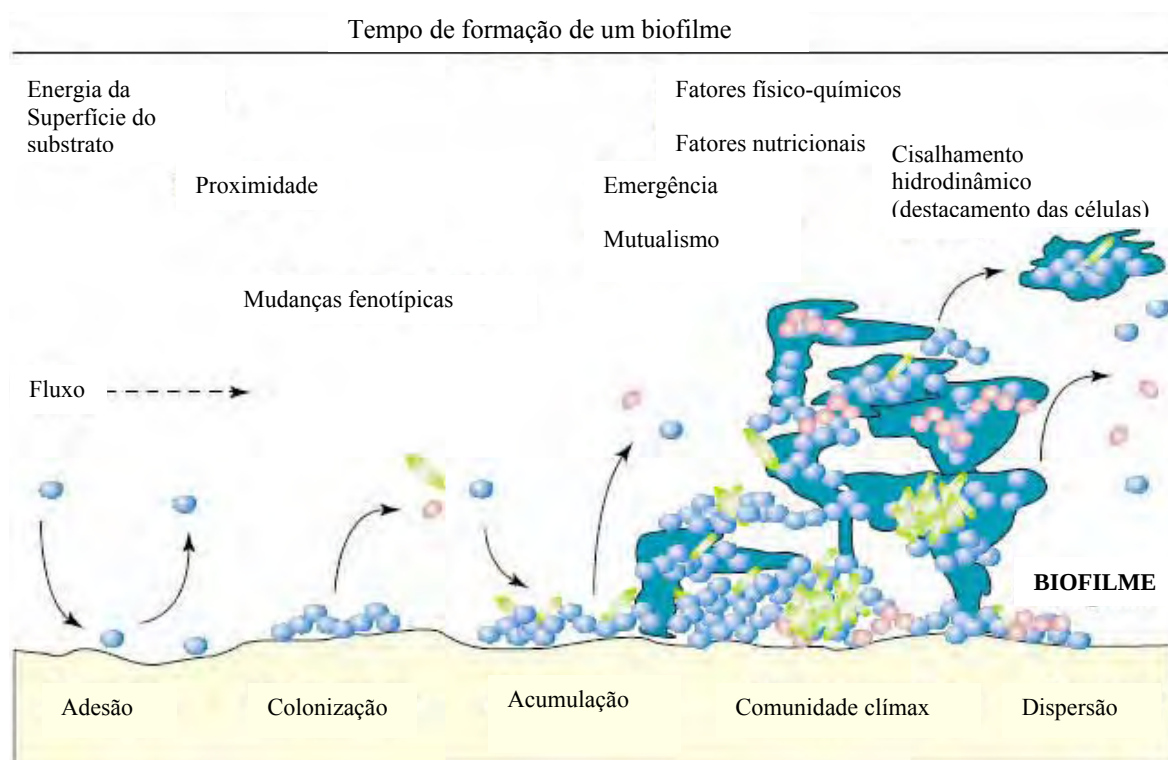


FIGURA 2 - Fases da formação de um Biofilme (Adaptado de Jenkinson; Lappin-Scott, 2001).

Sabe-se, que os biofilmes bacterianos exibem uma maior resistência a tratamentos antimicrobianos quando comparados às células individuais crescendo em suspensão. Esta aumentada resistência tem sido amplamente verificada e atribuída a diversos fatores, os quais exercem sua influência de forma combinada, a citar: a natureza do biofilme, reduzida difusão do agente antimicrobiano, mudanças fisiológicas devido à reduzida taxa de crescimento, e a produção de enzimas degradantes das substâncias antimicrobianas (BOYD; CHAKRABATY, 1995; KUMMAR; ANAND, 1998).

O termo resistência tem sido definido como a habilidade permanente ou temporária de um organismo e a progênie de permanecerem viáveis e, ou, multiplicar-se sob condições ambientais ou que inativam outros membros (CLOETE, 2003). Para Simões *et al.* (2006), o desenvolvimento do biofilme, seu comportamento, as características da população e a resposta à ação de agentes

antimicrobianos são fortemente influenciados por vários fatores ambientais, tais como as forças físicas que agem sobre o biofilme e as propriedades biológicas intrínsecas.

Muitos estudos têm postulado que a matriz de exopolissacarídeo, produzida pelas células que compõem o biofilme, além de agir como uma barreira física efetiva, confere ao mesmo a capacidade de restringir a penetração química de reativos biocidas, antibióticos catiônicos e peptídeos antimicrobianos que chegariam aos sítios de ação do biofilme. Apesar de numerosos estudos terem analisado o papel desempenhado pela limitação de difusão da resistência do biofilme, muitos dos resultados relatados sobre o assunto são contraditórios (DRENKARD, 2003).

Algumas vezes, a matriz de exopolissacarídeos é capaz de sequestrar cátions, metais e toxinas, conferindo também proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI, 2008).

Abaixo, a figura 3 apresenta um esquema do mecanismo de resistência a agentes antimicrobianos:

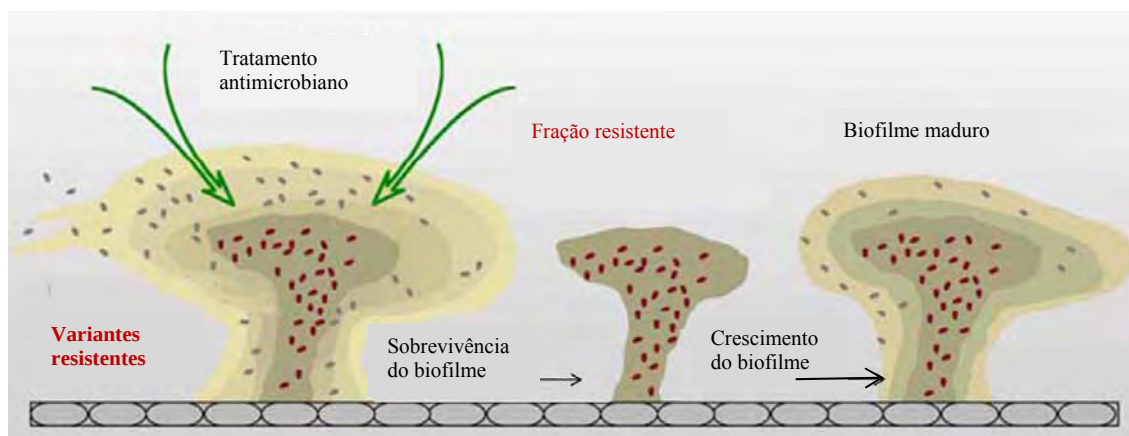


Figura 3 - Mecanismo de resistência mediado por variações fenotípicas. O tratamento antimicrobiano no biofilme bacteriano leva à erradicação da maioria da população suscetível do biofilme. Uma pequena fração fenotípica (representada pelas bactérias na cor vermelha) sobrevive ao tratamento antimicrobiano e é capaz de iniciar o desenvolvimento de um novo biofilme uma vez que o tratamento antimicrobiano é interrompido (Adaptado de DRENKARD, 2003).

Estudos prévios observaram que desinfetantes como ácido peracético, cloreto de mercúrio e formaldeído não tem apresentado eficácia na eliminação da massa celular de biofilmes bacterianos (FRANKI; KOFFI, 1990; CARPENTIER; CERF, 1993). Assim, agentes antimicrobianos, em geral, são mais efetivos na

inibição de células crescentes ativamente, ou seja, os melhores desinfetantes para a aplicação no controle de células planctônicas não são necessariamente adequados para aplicação contra células do biofilme (AMMOR *et al.*, 2004).

Rossoni; Gaylarde (2000) compararam a eficácia de ácido peracético e hipoclorito de sódio na remoção de células bacterianas aderidas em superfícies de aço inoxidável utilizadas em processamento de alimentos usando cepas de *E. coli*, *P. fluorescens* e *S. aureus*, e verificaram que, contrariamente à outras pesquisas, o hipoclorito de sódio foi mais eficiente que o ácido peracético nas concentrações utilizadas (250 a 1000mg de ácido peracético e 100 a 200mg de hipoclorito de sódio).

Pesquisas enfatizando a resistência de biofilmes formados por bactérias veiculadas por alimentos têm indicado que a resistência frente a vários sanitizantes é mais pronunciada em biofilmes “maduros” em relação a biofilmes mais jovens (HOLAH *et al.*, 1990; LEE; FRANK, 1991; WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992).

Diferentes autores têm relatado acerca da persistência de elevados números de bactérias patogênicas (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica*, *Campylobacter jejuni*, *S. typhimurium*) e deteriorantes (*Micrococcus*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*) de importância em alimentos sobre superfícies de serviços de alimentação (JIANG; DOYLE, 1995; KUSUMANINGRUM *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2006).

Os protocolos de limpeza e desinfecção inadequados levam a concentrações sub-letais dos desinfetantes possibilitando a permanência de micro-organismos remanescentes sobre as superfícies com possível formação subsequente de biofilme (CABO, M. L.; HERRERA, J.J.; CRESPO, M.D.; PASTORIZA, L., 2009).

2.4 Sanitizantes químicos

Na cadeia de produção de alimentos, em específico, há correlação positiva entre a falha nos procedimentos de higiene e a formação de biofilmes bacterianos, pois, havendo condições, as células aderidas evoluem para microcolônias e, assim, posteriormente, ao biofilme maduro (BOARI, 2008).

Os biofilmes podem ser investigados para a prevenção de sua formação, controle ou erradicação, quando a utilização de compostos biocidas é freqüentemente considerada. O uso destes compostos, portanto, é de grande importância e requer minuciosa determinação quanto à concentração apropriada para aplicação. Dosagens abaixo do nível necessário causam falsa segurança, seleção de micro-organismos e, conseqüentemente, a ocorrência de surtos de contaminação, enquanto que, acima do necessário, além dos aspectos econômicos, há a problemática de toxicidade ocupacional entre os envolvidos com a manipulação do produto (CAPELLETTI, 2006).

Desinfetantes (ou biocidas químicos) podem ser definidos como qualquer substância que contém um ou mais agentes ativos, capaz de prevenir, inibir, diminuir ou eliminar a ação de organismos vivos patogênicos e não patogênicos (CAPELLETTI, 2006). Estes diferem de antibiótico em sua relativa falta de toxicidade seletiva e uma falta, muitas vezes implícita, de alvos específicos (DENYER; STEWART, 1998).

Os biocidas ainda representam a contramedida mais significativa para controlar a formação de biofilme. No entanto, essas substâncias químicas podem eliminar os micro-organismos aderidos, mas não serem eficazes na remoção do biofilme, permanecendo células viáveis na superfície que poderão contribuir para a recuperação e regeneração do biofilme bacteriano (SIMÕES *et al.*, 2006).

Segundo Denyer; Stewart (1998) os biocidas agem nos componentes celulares funcionais, principalmente na parede celular, nos componentes da membrana citoplasmática e no citoplasma. Isto é determinado pela composição química e propriedades físico-químicas que cada biocida apresenta, bem como pelas interações com o material extracelular, pela composição química e morfologia das células.

De acordo com seu caráter químico, os biocidas podem ser classificados em dois grandes grupos: oxidantes (tais como ozônio, peróxido de hidrogênio, compostos de cloro) e não-oxidantes (compostos sulfurados, estanho, isotiazolinonas, sais de cobre, aldeídos e sais quaternários de amônio) (CAPELLETTI, 2006).

Os sanitizantes ácidos e aniônicos são compostos por ácidos orgânicos, como o cítrico, e surfactantes aniônicos, como o lauril sulfato de sódio. Sendo

agentes sanitizantes para frutas e verduras, são eficazes contra *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e outras bactérias (JAY, 2005).

O saneamento de equipamentos de plantas de processamento de alimentos é importante para o controle da contaminação cruzada durante as etapas que envolvem a produção. A limpeza realizada regularmente pode eliminar apenas alguns dos micro-organismos encontrados nos equipamentos. Assim, a escolha de um antimicrobiano a ser aplicado na etapa de sanitização deve ser feita de forma cuidadosa, tendo em consideração os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície a ser desinfetada (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Soma-se à ação de reduzir a quantidade de micro-organismos nas superfícies, um programa de higienização que deve ser eficiente na remoção de produtos residuais e corpos estranhos a fim de assegurar a qualidade dos alimentos produzidos (AMMOR *et al.*, 2004).

A higienização é utilizada com o objetivo de preservar a qualidade microbiológica dos alimentos, pelo controle e pela prevenção da formação de biofilmes, auxiliando na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo risco a saúde do consumidor (CAIXETA, 2008).

Os sanitizantes mais usados nas indústrias de alimentos incluem agentes oxidantes (hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, ozônio e ácido peracético); agentes desnaturantes (como os produtos à base de álcool); compostos com ação oxidantes, além de agentes que diminuem a tensão superficial, e componentes a base de enzimas (WIRTANEN *et al.*, 2001).

O hipoclorito, em suas várias concentrações, é um composto sanitizante halogenado, que teve seu primeiro uso registrado em 1792 com o nome de “água de Javele” obtido através da mistura de hipoclorito de sódio (NaOCl) e potássio (SENA, 2004).

O cloro, nas suas várias formas, consiste no sanitizante mais utilizado em alimentos. Os compostos à base de cloro são germicidas de amplo espectro de ação, que reagem com as proteínas da membrana das células microbianas, interferindo no transporte de nutrientes e promovendo a perda de componentes celulares. O hipoclorito de sódio (NaOCl) corresponde ao sanitizante químico de maior utilização, em função de sua rápida ação, fácil aplicação e completa dissociação em água (NUNES *et al.*, 2010).

O hipoclorito de sódio, assim como a maioria dos compostos clorados, quando em solução aquosa, libera o ácido hipocloroso em sua forma não dissociada (Figura 4), o qual é responsável pela ação antimicrobiana do sanitizante. Esta é uma reação que sofre influência do pH, visto que é determinante na quantidade de ácido hipocloroso em solução (ROSADO, 2009).

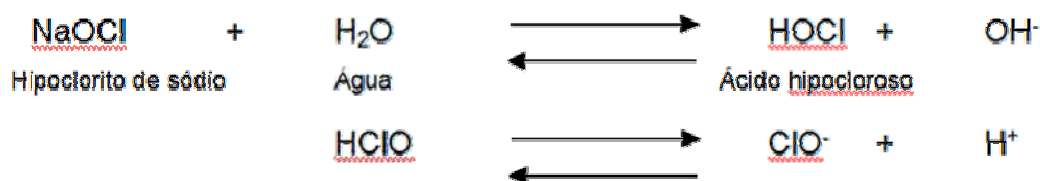


Figura 4 - Reação de dissociação do hipoclorito de sódio em solução aquosa.

Segundo Estrela *et al.* (2002), a ação sanitizante do hipoclorito de sódio está relacionada à sua capacidade de promover alterações celulares biossintéticas, destruição de fosfolipídios das membranas celulares, degradação de ácidos graxos e lípidos, e à ação oxidante causadora de inibição enzimática irreversível.

O sanitizante ácido peracético é comercializado na forma de uma mistura em equilíbrio, constituída por ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante (Figura 5), sendo que a reação ocorre em presença de um ácido mineral como catalisador, sendo geralmente mais utilizado o ácido sulfúrico (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).



Figura 5 - Reação de formação do ácido peracético.

Segundo Bálamo (2009) o ácido peracético na concentração de 0,09% a 0,15% é derivado da molécula acetilcaprolactam (50%) mais peróxido de hidrogênio a 3%, com um pH entre 5,5 e 7,0. É bactericida, fungicida, viruscida em 10 minutos de contato, e esporocida em 30 minutos.

A portaria nº 122, de 29 de novembro de 1993, incluiu o ácido peracético na portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988, para uso como desinfetante ou esterilizante em ambiente hospitalar (BRASIL, 1993):

O ácido peracético tem sido amplamente utilizado como desinfetante e esterilizante em muitas indústrias, incluindo o processamento de alimentos, bebidas, médica e farmacêutica, e como um agente de descoloração em indústrias têxteis e de celulose e papel (KITIS, 2004).

Embora o peróxido de hidrogênio também seja um desinfetante que contribui para o poder de desinfecção da mistura de peróxido de ácido acético (PAA ou ácido peracético), o PAA é um agente antimicrobiano mais potente que o peróxido de hidrogênio, sendo ativo em baixas concentrações contra um amplo espectro de micro-organismos. Os principais inconvenientes associados à desinfecção com ácido peracético são o aumento do teor de matéria orgânica no efluente, o retorno do crescimento microbiano potencial devido à permanência de ácido acético (também é um produto do ácido peracético em decomposição) e menor eficiência contra alguns vírus e parasitas (KITIS, 2004; ROSADO, 2009).

Dentre os aspectos positivos, o ácido peracético apresenta características como excelente ação sanitizante contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e esporos; ação em baixas temperaturas; permanência de sua atividade em presença de matéria orgânica; não sofre influência da dureza da água (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008); não produz compostos tóxicos ou carcinogênicos, já que não reage com as proteínas dos alimentos; e apresenta baixo impacto ambiental (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

3 METODOLOGIA

3.1 Cepas teste

O conjunto das cepas de *Staphylococcus aureus* (S3, S28 e S54) utilizadas nesta pesquisa foi obtido do banco de cepas existente no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba), as quais foram isoladas de superfícies de preparo de carnes e de vegetais de diferentes Unidades de Alimentação da cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil) de acordo com os procedimentos descritos por Vanderzant; Splittstoesser (1992).

3.2 Superfícies teste

Nos ensaios de capacidade de adesão, cinética de separação, perfil de formação de biofilmes e resistência a sanitizantes foram utilizados microsistemas de análise, os quais incluíram a utilização de minissuperfícies (20 x 20mm). Nestes experimentos foram utilizados minissuperfícies de aço inoxidável e polipropileno, visto que tais materiais são amplamente utilizados na composição de superfícies, equipamentos e/ou utensílios utilizados nos variados tipos de serviços de alimentação.

Antes de cada experimento, as minissuperfícies foram individualmente higienizadas com sua imersão em detergente neutro por 1 hora, e limpas com álcool a 70%. Em seguida, foram submetidas a uma nova lavagem com água destilada, secas a 60 °C por 1 hora, e esterilizadas por meio de uso de autoclave (121°C, 15 min, 1 ATM).

3.3 Elaboração de caldo base carne e caldo base vegetal

Nos ensaios de capacidade de adesão, cinética de separação, capacidade de formação de biofilme e do efeito de diferentes sanitizantes sobre a sobrevivência das cepas de *S. aureus* foram utilizados caldo base carne e caldo base vegetal como meio de inoculação. Para preparação do caldo base carne, aproximadamente 500 g de carne bovina tipo magra foram cozidas em 1000 mL de água destilada

esterilizada durante 20 minutos. Em seguida, a porção líquida do material de cozimento foi separada do material sólido, e submetida à filtração com a utilização de bomba a vácuo. O filtrado obtido foi esterilizado por filtração usando Millipore 0,45µm.

Para a preparação do caldo base vegetal, aproximadamente 500 g de uma mistura de vegetais (alface, tomate, cenoura, 1:1:1) foi homogeneizada com 1000 mL de água destilada esterilizada com o uso de liquidificador doméstico. Em seguida, a porção líquida do material foi separada do material sólido, e submetida a várias etapas de filtração através da utilização de bomba a vácuo. O filtrado obtido foi esterilizado por filtração usando Millipore 0,45µm. Os caldos obtidos foram armazenados a -20°C em alíquotas de 50mL e quando necessárias eram descongeladas sob refrigeração a 7°C ±1°C.

3.3.1 Análise da composição dos caldos base carne e vegetal

Os caldos base carne e base vegetal foram caracterizados no que diz respeito a sua composição físico-química (acidez, umidade, proteínas, lipídios, carboidratos e conteúdo mineral) e valor de pH.

Para a determinação de pH foi utilizado potenciômetro previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do fabricante. A acidez em percentual foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1N (IAL, 2005). A determinação de umidade foi realizada procedendo-se secagem, até obtenção de peso constante com utilização de estufa com temperatura estabilizada a 105 °C por 24 horas consecutivas, segundo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Para a determinação do conteúdo de lipídeos utilizou-se solução de sulfato de sódio a 1,5% (pesa-se 15g de sulfato de sódio e dilui-se, aferindo-se para 1000mL de solução) e solução de clorofórmio:metanol (2:1) de acordo com método descrito por Folch *et al.* (1956). Para quantificação de proteínas utilizou-se o método de Micro-Kjedahl, com o fator 6,25 multiplicando pela porcentagem de nitrogênio quando da determinação para caldo base carne; e 5,75 multiplicando pela porcentagem de nitrogênio quando da determinação para caldo base vegetal - métodos AOAC, 991.20 e 991.23 (AOAC, 2000). As cinzas (resíduo mineral fixo) foram analisadas pelo método 437 IV descrito pelo IAL (2005). Os carboidratos foram obtidos pela diferença entre os valores de proteínas, lipídeos e umidade, totalizando 100% da amostra.

Na Tabela 2 são apresentados os dados de composição química do caldo base carne e caldo base vegetal utilizados como substrato para o crescimento microbiano no presente estudo.

Tabela 2: Composição físico-química dos caldos à base de carne e vegetais.

Caldo base vegetal	
pH (T= 27,5°C)	5,69
Acidez	0,89%
Proteínas	0,18%
Lipídeos	0,11%
Umidade	98,32%
Carboidratos	1,39%
Cinzas	-
Caldo base carne	
pH (T= 32,5°C)	6,61
Acidez	2,83%
Proteínas	0,96%
Lipídeos	0,33%
Umidade	97,96%
Carboidratos	0,75%
Cinzas	0,21%

3.4 Condições experimentais

Os ensaios de capacidade de adesão, cinética de separação e capacidade de formação de biofilme das cepas de *S. aureus* foram realizados sob diferentes condições experimentais, a citar:

1. Na presença de um meio rico em nutrientes utilizando caldo base carne incubado a 28°C (temperatura usual verificada em Unidades de Alimentação);
2. Na presença de um meio rico em nutrientes utilizando caldo base carne incubado a 7°C (que caracteriza uma temperatura de refrigeração, tendo em vista o armazenamento de alimentos em ambiente refrigerado);
3. Na presença de um meio rico em nutrientes utilizando caldo base vegetal incubado a 28°C;
4. Na presença de um meio rico em nutrientes utilizando caldo base vegetal incubado a 7°C;

3.5 Avaliação da capacidade de adesão

No ensaio de capacidade de adesão foi adicionada uma alíquota de 100 µL de caldo base carne ou do caldo base vegetal às minissuperfícies. Em seguida, uma alíquota de 50 µL do inóculo bacteriano foi adicionada a cada minissuperfície.

A determinação do número de células aderidas nas superfícies submetidas às diferentes condições experimentais foi realizada através da retirada das minissuperfícies do sistema de incubação, seguida pela imersão das minissuperfícies por 10 segundos em placas de Petri contendo 10 mL de água peptonada 0,1% esterilizada, com a finalidade de liberação das células não aderidas. Posteriormente, as células aderidas foram coletadas com a fricção de dois swabs (zaragatoa) umedecidos em solução salina 0,85% esterilizada em toda a área da minissuperfície. As porções finais dos swabs que entraram em contato com as superfícies foram assepticamente cortadas, utilizando-se bisturi esterilizado, e homogeneizadas (utilizando homogeneizador de amostra tipo *Stomacher*) com água peptonada 0,1% esterilizada. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} – 10^{-4}) em água peptonada 0,1% esterilizada. Após este procedimento, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram plaqueadas em ágar nutriente e incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. O número de células aderidas à superfície foi determinado nos intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados foram expressos em unidade formadoras de colônia por centímetro quadrado - ufc/cm² (HERRERA *et al.*, 2007; RODE *et al.*, 2007).

3.6 Cinética de separação

Após 24, 48 e 72 horas de incubação das diferentes minissuperfícies sob as variadas condições experimentais citadas no item 3.4, as células não aderidas de *S. aureus* foram liberadas das minissuperfícies após lavagem durante 10 segundos com água peptonada 0,1% esterilizada. Após este procedimento, as minissuperfícies foram colocadas sobre placas de ágar nutriente e, depois de 2 minutos, removidas e postas sobre uma segunda placa de ágar nutriente. Este procedimento foi repetido por meio de uma sucessão de 7 placas de ágar nutriente. O número de células

separadas em cada placa nos diferentes números de ordem foi determinado com intensa homogeneização do bloco de ágar nutriente de cada placa em água peptonada 0,1% esterilizada utilizando homegeneizador de amostras tipo *Stomacher*. As misturas foram diluídas seriadamente em água peptonada 0,1% esterilizada (10^{-2} – 10^{-4}), e alíquotas de 100µL de cada diluição seriada foram plaqueadas em ágar nutriente, seguido por incubação em estufa a 35 °C por 48 horas. Os resultados foram expressos em ufc/cm² em cada número de ordem de transferência (HERRERA *et al.*, 2007).

3.7 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

As minissuperfícies (cinco para cada tipo de superfície) esterilizadas foram mergulhadas em 10 mL do meio de crescimento adicionado de 2,5 mL do inóculo microbiano em placas de Petri esterilizadas, seguido por incubação durante 72 horas. Após este período, as minissuperfícies foram removidas do meio de crescimento e lavadas com água peptonada 0,1% esterilizada para remoção das células não aderidas. Em seguida, as minissuperfícies foram novamente imersas no meio de crescimento fresco adicionado de 2,5 mL do inóculo microbiano, sendo incubadas a 7°C e 28°C por 72 horas. Este processo foi repetido quatro vezes completando um período de 15 dias, com o objetivo de alcançar a formação desejada do biofilme. Após o período de incubação, duas minissuperfícies de cada tipo de material foram assepticamente removidas de cada placa, e lavadas com água peptonada 0,1% esterilizada. O biofilme microbiano de cada superfície foi removido através da utilização de *swab* esterilizado umedecido em solução salina 0,85% esterilizada, de modo que as porções finais dos *swabs* que entraram em contato com as superfícies foram assepticamente cortadas, utilizando-se bisturi esterilizado, e homogeneizadas (utilizando homegeneizador de amostra tipo *Stomacher*) com água peptonada 0,1% esterilizada. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} – 10^{-4}) em água peptonada 0,1% esterilizada, e alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em ágar nutriente e incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Os resultados foram expressos em ufc/cm² (MARQUES *et al.*, 2007).

3.8 Efeito da aplicação de sanitizantes sobre a matriz celular do biofilme

A eficiência da aplicação de sanitizante na destruição de células na matriz do biofilme formado nas minissuperfícies foi analisada utilizando os sanitizantes hipoclorito de sódio (2,5 %) e ácido peracético (0,3 %). Inicialmente, foram preparadas soluções de 200 mL de cada sanitizante nas suas respectivas concentrações em água destilada esterilizada. Em seguida, duas minissuperfícies (previamente submetidas às diferentes condições experimentais para formação de biofilmes como descrito no item 3.6, foram lavadas com água peptonada 0,1% esterilizada e imersas em placas de Petri contendo 5 mL da solução do sanitizante por 1 minuto. Em seguida, as minissuperfícies foram retiradas da solução sanitizante e imersas em solução neutralizante de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a 10% por 30 segundos (quando utilizada a solução de hipoclorito de sódio). As células remanescentes nas minissuperfícies foram coletadas através de fricção de dois swabs esterilizados embebidos em solução salina 0,85% esterilizada em toda a área da minissuperfície. As porções finais dos swabs que entraram em contato com as superfícies foram assepticamente cortadas, utilizando-se bisturi esterilizado, e homogeneizadas (utilizando homogeneizador de amostra tipo *Stomacher*) com água peptonada 0,1% esterilizada. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} – 10^{-4}) em água peptonada 0,1% esterilizada, e alíquotas de 100 μL de cada diluição foram inoculadas em ágar nutriente. O sistema foi incubado em estufa a 35 °C por 24 horas. Os resultados foram expressos em ufc/cm². Paralelamente, foi realizado um experimento controle, onde a solução do sanitizante foi substituída por água destilada esterilizada (AMMOR *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2007).

A diferença entre as contagens de *S. aureus* (ufc/ml) obtidas no experimento controle e nos experimentos tratados com o sanitizante representou a eficiência de redução da população bacteriana da cepa ensaiada no biofilme. Ainda, ao final do tratamento com os diferentes sanitizante, duas microsuperfícies de cada tipo de material foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura para avaliação das características do biofilme após o tratamento.

Todas as análises envolvidas neste estudo foram realizadas em triplicata, de modo que os resultados foram apresentados como média dos três ensaios paralelos.

3.9 Procedimentos de microscopia eletrônica de varredura

As amostras submetidas à formação de biofilme em superfícies de polipropileno e aço inoxidável nas duas temperaturas ensaiadas antes e após a exposição aos sanitizantes foram observadas usando microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as minissuperfícies foram inicialmente imersas e pré-fixadas em glutaraldeído a 2% por 2h a 4°C. Um procedimento de pós-fixação foi realizado usando uma solução de tetróxido de ósmio a 2% por 30 min a 30°C. Após cada fixação as células foram lavadas duas vezes com PBS, secas em um ponto crítico em CO₂ líquido sob pressão de 95 bar e, em seguida, cobertas com ouro (10 nm fino coberto por pulverização catódica JFC-1100, JEOL Ltd., Tóquio, Japão). Finalmente, as células foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (FEI QUANTA 200F), como descrito por MARQUES et al, 2007; KUMAR et al, 1998; Zoltai et al, 1981.

3.10 Análises estatísticas

As contagens foram convertidas para valores decimais logarítmicos ($\log \text{ufc/cm}^2$) para quase coincidir com a hipótese de uma distribuição normal. Os valores obtidos para o desprendimento, a adesão e a formação de biofilme foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan para determinar a influência significativa da temperatura de incubação e da superfície de contato. As contagens obtidas para o efeito dos sanitizantes (antes e depois da aplicação) na matriz do biofilme foram comparados usando o teste t pareado de Student. Os dados foram analisados utilizando o software Statistica 7. Um valor de probabilidade (P) <0,05 foi aceito como indicador de uma diferença significativa.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.C.C.; KUAYE, A.Y.; SERRANO, A.M.; ALMEIDA, P. F.. Microbial evaluations and control workers' hands. **Revista de Saúde Pública**. v. 29, n.4, p. 290-294, 1995.
- AMMOR, S.; CHEVALLIER, I.; LAGUET, A.; LABADIE, J.; TALLON, R.; DUFOUR, E. Investigating of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. **Food Microbiology**. v. 21, n.1, p.1-17, 2004.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E.A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**. v.61, n. 7, p.833-838, 1998.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.
- ANDRADE, N.J.; SILVA, R.M.M.; BRABES, K.C.S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**. V.27, n.3, p.590-596, 2003.
- ANDRÉ, M.C.D.P.B.; CAMPOS, M.R.H.; BORGES, L.J.;; KIPNIS, A.; PIMENTA, F.C.; SERAFINI, A.B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**. v.19, n.2, p.200-207, 2008.
- AOAC. *Official Methods of Analysis*. 14th ed. Ass. Off. Analytical. Chem., Washington, USA, 2000.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, n.6, p.2151–2156, 2001.

ARMON, R.; STAROSVETZKY, J.; ARBEL, T.; GREEN, M. Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems. **Water Science and Technology**. v.35,n.11-12, p. 293–300, 1997.

ARTHUR, R. A.; TABCHOURY, C.P.M.; MATTOS-GRANER, R.O.; CURY, A.A.D.B.; LEME, A.F.P.; VALE, G.C.; CURY, J.A. Genotypic diversity of *S. mutans* in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure. **Brazilian Dental Journal**. v.18, n.3, p.185-191, 2007.

BAILLIF, S.; ECOCHARD, R.; CASOLI, E.; FRENEY, J.; BURILLON, C.; KODJIKIAN, L. Adherence and kinetics of biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* to different types of intraocular lenses under dynamic flow conditions. **J Cataract Refract Surg**. v.34, n.1, p.153–158, 2008.

BALABAN, M.S.; RASOOLY, A. *Staphylococcal* enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**. v. 61, n.1, p. 1-10, 2000.

BALDISSERA, R.L. & MENEGHEL, S.N. Investigação epidemiológica de um surto de gastroenterite. **Revista de Saúde Pública**. v.20, n.3 , p. 212-8, 1986.

BARNES, L.M.; LO, M.F.; ADAMS, M.R.; CHAMBERLAIN, A.H.L. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p. 4543–4548, 1999.

BEEKEN, K.E.; DUMMAN, P.M.; McALEESE, F.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; PROJAN, S.J.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 14, p. 4665-4684, 2004.

BELKUM, A.V.; KOOLS-SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. **Journal of Microbiological Methods**.v. 48, n.1, p. 19-42, 2002.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophyla* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BOYD, A.; CHAKRABATY, A.M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. **Journal of Indian Microbiology**, v.15, n.3, p. 162-168, 1995.

BRAGA, L.C.; SHUPP, J.W.; CUMMINGS, C.; JETT, M.; TAKAHASHI, J.A.; CARMO, L.S.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.A. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.1-2, p. 335-339, 2005.

BRANDA, S. S.; VIK, Å.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R.. Biofilms: the matrix revisited. **TRENDS in Microbiology**. v.13, n.1, p.20-26, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 122 de 29 de novembro de 1993. Inclui na Portaria nº 15 de 23 de agosto de 2008, sub-anexo I, alínea I, o princípio ativo ácido peracético, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes. **Diário Oficial da União**. Brasília. 01 de dezembro de 1993. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=5334&word>. Acesso em: 10 de outubro de 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, de 01 de agosto de 1997. Disponível em: <http://pnass.datasus.gov.br/documentos/normas/57.pdf> . Acesso em: 10 de março de 2011.

BUCKINGHAM-MEYER, K.; GOERES, D.M.; HAMILTON, M.A. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. **Journal of Microbiological Methods**, v.70, n.2, p. 236-244, 2007.

CABO, M. L.; HERRERA, J.J.; CRESPO, M.D.; PASTORIZA, L. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and Benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. **Food Control**. v.20, n.5 , p.521-525. 2009.

CAIXETA, D. S. **Sanitizantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; CAMPANILE, F.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. G.; SELAN, L.; ARTINI, M.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbiology and Infection**. v.10, n.12, p. 1081-1088, 2004.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da Atividade de Biocidas em Biofilmes formados a partir de Fluido de Corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 97p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**. v.75, n.1, p. 499-511, 1993.

CERI, H.; OLSON, M.E.; STREMICK, C.; READ, R.R.; MORK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: A new technology form the rapid determination of antibiotic susceptibility of bacterial biofilms. **Journal of /clinical Microbiology**. v.37, n.6, p.1771-1776, 1999.

CHENG, G.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; BRYERS, J. D.; JIANG, S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**. v.28, n.29 , p. 4192–4199, 2007.

CHMIELEWSKI, R.A.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Microbiology**. v.2, n.1, p. 22-32, 2003.

CHUARD, V.; VAUDAUX, P.E.; PROCTOR, R.A.; LEW, P.D. Resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from infected foreign body to killing by antimicrobials. **Journal of Infectious Diseases**. v.163, n.6 , p. 1369-1373, 1997.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds International. **Biodeterioration & Biodegradation**. v.51, n.4, p. 277– 282, 2003.

COELHO, A.I.M.; MILAGRES, R. C. R. M.; MARTINS, J.F.L.; AZEREDO, R.M.C.; SANTANA, A.M.C. Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.15, n.1, p.1597-1606, 2010.

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O’GARA, J. P. *icaR* Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of *ica* Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**. v.184, n.16, p. 4400–4408, 2002.

COSTA, P.D.C.; ANDRADE, N.J.; BRANDÃO, S.C.C.; PASSOS, F.J.V.; SOARES, N.F.F. Atp-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, n.3, p.345-349, 2006.

COSTERTON, J.W.; STEWARD, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v.284, n.5418, p. 1318-1322, 1999.

COSTERTON, W. J.; WILSON, M. Introducing Biofilms. **Biofilms**. v.1, n.1, p.1–4, 2004.

CRAMTON, S.E.; ULRICH, M.; GÖTZ, F.; DÖRING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**. v.69, n. 6, p. 4079-4085, 2001.

CUCARELLA, C.; TORNO, M.A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZON, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADE, J.R. Role of biofilms-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunology**. v.72, n. 4, p. 2177-2185, 2004.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.64, n.4, p.847–867, 2000.

DAVIES, D. G.; GEESEY, G. G. Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Development in Continuous Culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, n. 3, p.860–867, 1995.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.41, n.3, p. 261-268, 1998.

DI POTO, A.; SBARRA, M. S.; PROVENZA, G.; VISAI, L.; SPEZIALE, P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Biomaterials**. v. 30, n.18, p.3158–3166, 2009.

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

DRENKARD, E. Review: Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**. v.5, n.13, p.1213–1219, 2003.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**. v.13, n.2, p.113-117, 2002.

FAUSTINO, J.S. *et al.* Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000 – 2006. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.66, n.1, p. 26-30, 2007.

FOLCH, J., Less, M., Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**. v.226, n.1, p. 497-509.

FRANK, J.F.; KOFFI, R.A. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**. v.53, n.7, p.550-554, 1990.

FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; MARTÍN, M.C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**. v.7, n.2, p. 187-194, 2005.

FURUKAWA, S.; AKIYOSHI, Y.; O'TOOLE, G. A.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. Sugar fatty acid esters inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.138, n.1-2, p.176-180, 2010.

FUSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUES-JEREZ, J.J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless surfaces. **Food Control**. v.19, n.3, p. 308-314, 2008.

FUX, C.A.; WILSON, S.; STOODLEY, P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in a in vitro catheter infection model. **Journal of Bacteriology**. v.186, n.14, p. 4486-4491, 2004.

GÂNDARA, A.L.N.; OLIVEIRA, J.S. Adesão de linhagens selvagens de *Streptococcus termophilus* em superfícies de aço inoxidável e efeitos da higienização sobre sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 20, n.1, p. 1-7, 2000.

GÖTZ, Friedrich. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**. v.43, n.6, p. 1367–1378, 2002.

GHIGO, JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**. v.412, n.6845, p. 442-5, 2001.

GUTIERREZ, G.; ABEE, T.; BOOTH, I.R. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**. v.28, n.2, p.233-244, 1995.

HARRIS, L. G.; RICHARDS, R. G. Staphylococci and implant surfaces: a review. **Injury, International Journal Care Injured**. v.37,n.2, p.3-14, 2006.

HERRERA, J.J.R.; CABO, M.L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**. v.24, n.6, p.585-591, 2007.

HEYDORN, A.; Nielsen, A.; T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBOLL, B. K.; MOLIN, S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**. v.146, n.10, p. 2395–2407, 2000.

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

HOLAH, J.T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**. v.11, n.5, p. 255-259, 1990.

HUSSAIN, M.; BECKER, K.; von EIFF, C.; PETERS, G.; HERMANN, M. Analogs of the extracellular adherence protein (Eap) are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology**.v. 8, n.6, p. 1271-1276, 2001.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Ed. Brasília, Ministério da Saúde. 1018p, 2005.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985. p. 27-28.

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos**/James M. Jay: trad. Eduardo César Tondo *et al.* 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAY, James M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1994.

JENKINSON, Howard F.; LAPPIN-SCOTT, Hilary M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**. v.9, n.1, p.9-10, 2001.

JIANG, X.P.; DOYLE, M.P. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteridis* on currency. **Journal of Food Protection**. v.62, n.7, p. 295-303, 1995.

JOHNSON, L. R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **Journal of Theoretical Biology**. v.251, n.1, p. 24–34, 2008.

JOSEPH, B.; OTTAS, S.K.; KARANUSAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**. v.64, n.3, p. 9-27, 1998.

KARUNASAGAR, I. Listeria in tropical fish and fishery products. **International journal of food microbiology**. v.62, n.3, p.177-81, 2000.

KAWASAKI, V.M.; CYRILLO, D.C.; MACHADO, F.M.S. Custo-efetividade da produção de refeições coletivas sob o aspecto higiênico-sanitário em sistemas *cook-chill* e tradicional. **Revista de Nutrição**. v.20, n.2, p. 129-138, 2007.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**. v.30, n.1, p.47-55, 2004.

KUMAR, C.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.42, n.1-2, p.9-27, 1998.

KUSUMANINGRUM, H.D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**. v.85, n.3, p. 227-236, 2003.

KUŽMAN, L.; RÓŻALSKI, M.; WALENKA, E.; RÓŻALSKA, H.; WYSOKIŃKA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. **Phytomedicine**. v.14, n.1, p. 31-35, 2007.

LATASA, C.; SOLANO, C.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Biofilm-associated proteins. **Comptes Rendus Biologies**. v.329, n.11, p. 849-857, 2006.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **The Journal of Hospital Infection**. v.64, n.4, p.313-325, 2006.

LOMANDER, A.; SCHREUDERS, P.; RUSSEK-COHEN, E.; ALI, L. Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. **Bioresource Technology**. v.94, n.3, p. 275–283, 2004.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MACK, D.; BECKER, P.; CHATTERJEE, I.; DOBINSKY, S.; KNOBLOCH, J.K.-M.; PETERS, G.; ROHDE, H.; HERMAN, M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 294, n.2-3, p. 203-212, 2004.

MADANI, N.B.; GREENLAND, T.; RICHARDS, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Veterinary Microbiology**. v.59, n.2-3, p. 139-145, 1998.

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 biofilm by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, n.3, p. 538-543, 2007.

MCBAIN, A. J.; BARTOLO, R.G.; CATRENICH, C.E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R.G.; RICKARD, A.H.; SYMMONS, S.A. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.1, p. 177-185, 2003.

MEAD, Paul S.; SLUTSKER, Laurence; DIETZ, Vance; MCCAIG, Linda F.; BRESEE, Joseph S.; SHAPIRO, Craig; GRIFFIN, Patricia M.; TAUXE, Robert V. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. v.5, n.5, p. 607-625, 1999.

MESQUITA, M. O.; DANIEL, A.P.; SACCOL, A. L. F.; MILANI, L. I. G.; FRIES, L.L.M. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.1, p. 198-203, 2006.

MICHELIN, AF; CARMO, L.S.; CARLOS, I.Z. Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p.46-49, 2006.

MORCK, D. W.; OLSON, M. E.; CERI, H.; Microbial Biofilms: preservation, control and removal. In: Disinfection, Sterilization and Preservation. Block, Seymour S. Editora Lippincott Williams and Wilkins, 5ª ed. 2001.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER, M. A. **Microbiologia Médica**. Ed. Elsevier. Rio de Janeiro. 2006.

MURGA, R.; FOSTER, T.S.; BROWN, E.; PRUCKLER, J.M.; FIELDS, B.S.; DONLAN, R.M.; Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. **Microbiology**. v.147, n.11, p. 3121-3126, 2001.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&name=Bacteria&lvl=3&srchmode=1&keep=1&unlock> . Acesso em: 10 de janeiro de 2010.

NIKOLAEV, YU. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm—"City of Microbes" or an Analogue of Multicellular Organisms?. **Microbiology**. v.76, n.2, p. 125–138, 2007.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**. v.230, n.2, p.191-195, 2004.

NUNES, E.E.; BOAS, E. V. B. V.; XISTO, A.L. R.P.; LEME, S. C.; BOTELHO, M. C. Avaliação de diferentes sanitizantes na qualidade microbiológica de Mandioquinha-

Salsa minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**. v.34, n.4, p.990-994, 2010.

O'TOOLE, D. K. Difference in egg yolk reactions on Baird-Packer medium between bovine and human strains of coagulase-positive staphylococci. **Letters in Applied Microbiology**. v.4., n.5, p.111-112. 1987.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**. v.54, n.1, p. 49–79, 2000.

OLIVEIRA, A.; CUNHA, M.L.R.S. Bacterial Biofilms with emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.14, n.4, p.572-596, 2008.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A. DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**. v.19, n.2, 178–185, 2008.

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

PEREIRA, G.I. **Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina a inoculado em queijo prato**. 2006. 102 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; TEIXEIRA, I.S.C.; LIMA, S.I.; CARNICEL, F.A.; HOFFMANN, F.L.. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.63, n.2, p.232-7, 2004

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; CARDIGA, E.A.; MARQUES, D.F.; CARNICEL, F.A.; HOFFMANN, F.L. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.65, n.2, p.112-117, 2006

PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C.; POZETTI, G. L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of Aluminum tubes both unlined and lined with epoxi resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, n.4, p.340-344, 2001.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**. v.17, n.4, p. 361-365, 2000.

PLANCHON, S.; GAILLARD-MARTINIE, B.; DORDET-FRISONI, E.; BELLON-FONTAINE, M.N.; LEROY, S.; LABADIE, J.; HÉBRAUD, M.; TALON R. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. **International Journal of Microbiology**. v.109, n.1-2, p. 88-96, 2006.

RAMEY, B.E.; KOUTSOUDIS, M.; BODMAN, S.B.V.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**. v.7, n.6, p.602-609, 2004.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. [Comunicação]. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.1, p.130-133. 2004.

RAY, BIBEK. **FUNDAMENTAL FOOD MICROBIOLOGY**. New York: CRC PRESS, 3rd ed., 2004.

RIEU, A.; LEMAÎTRE, J. P.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, n.1-2, p. 76-82, 2008.

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

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.

ROSADO, M. S. **Biofilme de *Enterococcus Faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes**

sanitizantes. 2009. 98p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**. v.61, n.1, p. 81–85, 2000.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FEITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. L.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. A. *Staphylococcus aureus* : visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.4, n.6, p. 413-423. 2007.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. **Journal of Bacteriology**. v.184, n.4, p.1140-1154, 2002.

SENA, N.T. **Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorexidina usados como substâncias químicas auxiliares frente a biofilmes de espécie única**. 2004. 170p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo.

SHI, X.; w, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**. v.20, n.9, p. 407-413, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; MACHADO, I.; M. PEREIRA, O.; VIEIRA, M. J. Control of Flow-Generated Biofilms With Surfactants: Evidence of Resistance and Recovery. **Food and Bioproducts Processing**. v.84, n.4, p.338–345, 2006.

SOUSA, C.P. The Impact of Food Manufacturing Practices on Food borne Diseases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 815-823, 2008.

SPOERING, A.S.; LEWIS, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobial. **Journal of Bacteriology**. v.183, n.23, p. 6746-6751, 2001.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**. v.56, n.1, p. 187–209, 2002.

SUNTHARALINGAM, P.; CVITKOVITCH, D. G. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. **Trends in Microbiology**. v.13, n.1, p.3-6, 2005.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**. v.147, n.1, p. 3-9, 2001,.

TATINI, S. R. Influence of food environments of growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal Milk Food Technology**. v.36, n.2, p.474, 1973.

TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. **Microbial Ecology**. v.40, n.2, p.75–84, 2000.

TUROVSKIY, Y.; KASHTANOV, D.; PASKHOVER, B.; CHIKINDAS, M.L. Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between. **Advances in Applied Microbiology**. v.62, n.1, p.191–234, 2007.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington American Public Health Association (APHA). 1992. 1219p.

VASSEUR, C.; RIGAUD, N.; HÉBRAUD, M.; LABADIE, J.; Combined effects of NaCl, NaOH, and biocides (monolaurin and lauric acid) on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. **Journal of Food Protection**. v.64, n.9, p. 1442-1445, 2001.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; PONT, A.; THIERY, R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animal species. **Veterinary Microbiology**. v.127, n.3-4, p. 407-411, 2008.

VIANA, E.S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicotróficas isoladas de leite**. 2006. 176p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

WALKER, J.T.; MARSH, P.D. Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. **Journal of Dentistry**. v. 35, n. 9, p. 721-730, 2007.

WALKER, J.T.; MARSH, P.D. A review of biofilms and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS). **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 54, n. 2-3, 87-98, 2004.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S, WAGENR, D.D.; McDERMOTT. P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infections**. v.4, n.4, p. 405-412, 2002.

WIRTANEN, G.; AHOLA, W.; MATTILA-SANDHOLM, T. Evaluation of cleaning procedures in elimination of biofilm from stainless steel surface in process equipment. **Food and Bioproducts Processing**. v.73, n.1, p. 9-16, 1995.

WIRTANEN, G.; SALO, S.; HELANDER, I.M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 20, n. 1, p. 37–50, 2001.

WHO/OMS (World Health Organization/Organização Mundial de Saúde). [homepage na Internet]. **Food Safety**. Disponível em: http://www.who.int/topics/food_safety/en/ Acesso em: 10 de julho de 2010.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J.S.; LOOSDRECHT, M.C.M.V. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**. v.76, n.1, p. 2-13, 2003.

ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**. v.46, n.1, p. 39-56, 1943.

ARTIGO 1

Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* to stainless steel and polypropylene surfaces and their disinfection

Biofilm formation by *Staphylococcus aureus*

Quênia Gramile Silva Meira¹, Isabella de Medeiros Barbosa¹, Ana Júlia Alves Aguiar Athayde¹, José Pinto de Siqueira Júnior², Evandro Leite de Souza¹

¹ Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

² Laboratory of Genetics of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Center for Sciences and Nature, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

Key words: *S. aureus*, food and nutrition services, surfaces, biofilm

*Author for correspondence: Evandro Leite de Souza
Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
Telefone: 83 3216 7807
Número de Fax: 83 3216 7094
E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

ABSTRACT

This study aimed to assess the capacity of adhesion, kinetic of separation and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* isolated from food services on stainless steel and polypropylene surfaces (2 x 2 cm) when cultivated in a meat-based broth at 28 and 7°C. It was also to study the efficacy of the sanitizers sodium hypochlorite (250 mg/L) and peracetic acid (30 mg/L) in inactivating the bacterial cells in the biofilm. *S. aureus* strains adhered in high numbers (4 – 6 log cfu/cm²) regardless the surface kind of surface and incubation temperature. Cells detachment of surfaces was of at least 10³ cfu/cm² during the first six contacts to agar, characterizing a high persistence over 72 h. Number of cells (10⁵ – 10⁷ cfu/cm²) needed for biofilm formation was noted at all experimental systems already after 3 days. Reduction of cells in biofilm matrix in a range of 2.6 – 3.7 log cfu/cm² was caused by peracetic acid, while for sodium hypochlorite it was in a range of 2.1 – 2.7 Log cfu/cm². From these results, the strains assayed here demonstrated high capability to adhere and form biofilm on polypropylene and stainless steel surfaces under different growth conditions. Moreover, the cells in biofilm matrix revealed resistance for total removal when submitted to exposure to sanitizers.

The surfaces that come into contact with foods are important source for transmission of microorganisms in food processing plants (2). Many pathogenic or spoilage bacteria can be found attached to surfaces in the form of planktonic cells or of sessile cells forming a biofilm (3, 23).

According to Costerton et al. (5) biofilms are aggregates of microbial cells surrounded by a matrix of exopolymers that confers resistance to certain involved microorganisms. Bacteria aggregated to form biofilms are cited to have greater resistance to stress conditions than the planktonic counterparts dispersed in the environment, including the

susceptibility to sanitizers and other antimicrobials (27, 6). Early studies found that bacterial adhesion and biofilm formation depend on the bacterial specie, the nature of the surface, the growth medium and other environmental conditions (16, 22).

The formation of biofilms on surfaces of food processing plants by pathogenic bacteria is a high risk source of cross contamination, since biofilm-adhered bacteria can detach during production and contaminate food as it passes the surfaces. *Staphylococcus aureus* has been frequently found in areas of food processing plants and recognized as being responsible for outbreaks related to the consumption of fresh and processed foods worldwide (2,4).

The pathogenesis of the intoxication caused by *S. aureus* depends on the ability of the strain to survive, multiply under a variety of conditions and produce various extracellular compounds (20). The capability of *S. aureus* to adhere and form biofilms can easy its survival and growth in food services areas meaning a physiological advantage in their possible role as etiological agent of foodborne diseases (9, 21, 28). Although some researchers have observed the ability to adhere and form biofilm by *Staphylococcus* genera (10, 15), the most studies have been addressed to clinical aspects related to the biofilm formation by *S. intermedius* on medical implants and materials (17, 8).

For food services, it is important to identify the conditions under which *S. aureus* can survive and multiply in the environment of processing, storage and distribution of foods. Regarding these aspects, this study was carried out with the aim of evaluating the capability of *S. aureus* isolated from food services surfaces to adhere and form biofilms on polypropylene and stainless steel surfaces when cultivated in a meat based broth under different temperatures. Still, it was observed the effect of sanitizers on the reduction of the viable cells on biofilm matrix.

MATERIALS AND METHODS

Test strains

S. aureus S3, *S. aureus* S28 and *S. aureus* S54 obtained from the Microorganism Collection, Laboratory of Food Microbiology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil were used as test microorganisms. These strains were isolated from different surfaces of Food Services by the standard procedures. Stock cultures were kept on Nutrient Agar – NA (Difco, Brazil) slants under refrigeration ($7 \pm 1^\circ\text{C}$).

Inocula used in antimicrobial assays were obtained from overnight cultures grown on NA slants at 37°C . A loopfull of the culture was diluted in sterile saline solution (0.85 g/100mL) to have a final concentration of approximately 10^8 colony forming unity per mL (cfu/mL) adjusted according to the turbidity of 0.5 McFarland standard tube.

Test surfaces and experimental conditions

AISI 304 stainless steel (2 x 2 x 0.2 cm) and polypropylene coupons (2 x 2 x 0.4 cm) were used as test surfaces. The coupons were individually cleaned, sanitized and sterilized according to procedure described by Marques et al. (17).

The adherence, detachment and biofilm formation of test strains on polypropylene and stainless steel surfaces when inoculated in a meat-based broth was assessed in two different incubation temperatures, 7 and 28°C .

Preparation of meat-based broth

Bovine meat steaks were trimmed for all external fat and cut in pieces of uniform sizes (3 x 3 x 3 cm). Meat pieces were boiled in distilled water during 20 min at 90°C . About 500 mL of meat broth were obtained and vacuum filtered using Whatman nº1. The filtrate was sterilized using autoclave for 15 min (1.21 atm). After that, the broth was stored at -20°C in

aliquots of 50 mL. When required one aliquot was thawed under refrigeration ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) and used for the experimental analysis.

The meat broth was characterized regarding the physico-chemical characteristics (acidity, moisture, protein, fat, carbohydrate, mineral content and pH value) according to procedures described by IAL (11, 12). The physico-chemical characteristics for the meat broth used in the assays are shown in Table 1.

Adhesion to surfaces and quantification of adhered cells

An aliquot of 100 μL of the growth media was plated onto the centre of each coupon. After that, an aliquot of 50 μL of the bacterial inoculum was added to and mixed with the growth media, followed for incubation under the pre-established temperature. After 24, 48 and 72 h of incubation, coupons (two for each treatment) were immersed in sterile peptone water - SPW (0.85 g/100mL) during 15 s for releasing non-adhered cells. The cells adhered to the coupons were collected by thoroughly rubbing their surfaces with two moistened swabs, which were resuspended in SPW by vigorously vortexing for 30 s. The mixture was serially diluted (10^{-1} - 10^{-5}) in SPW and aliquots of 100 μL were spread plated onto sterile NA plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C (8, 24). After the incubation period, the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm^2 .

Kinetic separation

An aliquot of 100 μL of the growth media was plated onto the centre of each coupon. After that, 50 μL of the bacterial inoculum was added to and mixed with the growth media, followed for incubation under the pre-established temperature. After 24, 48 and 72 h of incubation, coupons (two for each treatment) were immersed in sterile SPW during 15 s for releasing non-adhered cells. After that, each coupon was placed on a sterile NA plate, and

after 2 min, removed and placed onto a second sterile NA plate. This procedure was repeated through 7 sterile NA plates. The number of detached cells on the NA plates with order number of 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 was found by transferring the agar blotting from each plate to 10 mL of SPW followed by blending using a Stomacher. The mixture was serially diluted ($10^1 - 10^{-4}$) in SPW and aliquots of 100 μ L were spread plated onto NA plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C (8). After the incubation period the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm².

Biofilm development and quantification

The level of biofilm formation by *S. aureus* S3 on polypropylene and stainless surfaces over 15 days when incubated in meat-based broth at 7 and 28°C was assessed. For this, five stainless steel and five polypropylene coupons were immersed in a sterile Petri dish containing 20 mL of the growth media and 2 mL of the bacterial inoculum. The dishes were sealed and incubated statically at the pre-established temperatures. After 3, 6, 9, 12 and 15 days of incubation, the coupons were withdrawn and washed with SPW to remove the non-adhered cells. Once again, the coupons were immersed in a fresh medium containing the same amount of inoculum, being the process repeated for four times, completing a 15-day period.

At each incubation interval, two coupons of each treatment were submitted to bacterial count in biofilm matrix. For this, the biofilm was scraped with two moistened sterile swabs, which were resuspended in 9 mL of SPW by vortexing for 15 s. Serial dilutions were prepared in SPW and aliquots of 100 μ L were spread plated onto sterile NA plates, followed for incubation at 37°C for 24 h (17). After the incubation period, the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm².

Sanitizer application

The efficacy of the sanitizers sodium hypochlorite (250 mg/L) and peracetic acid (30 mg/L) in destroying the cells of *S. aureus* S3 in the biofilm matrix when grown in meat-based broth at 28 and 7°C was assessed. For this, five coupons were permitted to develop biofilm according to the experimental conditions before cited. After 15 days of incubation, the coupons were washed in SPW, immersed for 30 s in sterile Petri dishes containing 20 mL of the sanitizer solution. Afterwards, the coupons were drawn of the sanitizer solution and immersed for 3 s in a neutralizing solution (0.1 M Na₂S₂O₃). The remaining cells were counted after scraping by the use of two sterile moistened swabs, which were resuspended by vigorously vortexing in 9 mL of SPW. Serial dilutions were prepared in SPW and aliquots of 100 µL were spread plated onto NA plates and incubated at 37 °C for 24 h (1, 17). After the incubation period, the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm². In control assays, the solutions of sanitizers were replaced by sterile distilled water. The efficiency of each sanitizer was calculated regarding the difference between the counts obtained for the control surfaces and for the surfaces submitted to the sanitizers application.

Procedures for scanning electron microscopy

Samples submitted to biofilm formation on polypropylene and stainless steel surfaces at 28°C according to the procedures before cited and after exposition to the sanitizers were observed for remaining of *S. aureus* cells in biofilm matrix using scanning electron microscopy. For this, the coupons were initially pre-fixed with glutaraldehyde (2 mL/100mL) for 2 h at 4°C. Postfixation was carried out using osmium tetroxide (2 mL/100mL) for 30 min at 30°C. After each fixation the cells were washed twice with 0.1 M phosphate buffer, dried at

a critical point in liquid CO₂ under 95 bar pressure, and then gold covered (Fine coat ion sputter JFC-1100, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Finally, the cells were examined with a scanning electron microscope (FEI QUANTA 200F) as previously described (17, 14, 31).

Statistical analysis

Counts were converted to decimal logarithmic values (log cfu/cm²) to nearly match the assumption of a normal distribution. The obtained values for adhesion, detachment and biofilm formation were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan test to determine significant influence of the incubation temperature and contact surface. The counts obtained for the effect of the sanitizers (before and after the application) on the biofilm matrix were compared using paired Student's t-test. Data were analyzed using the software Statistica 7. A probability value (*P*) <0.05 was accepted as indicating significant difference.

RESULTS AND DISCUSSION

Regarding that the substrate and extrinsic characteristics has been reported to influence the bacterial adherence, a food based media (meat broth) and two incubation temperatures (7 and 28°C) were tested in respect of enhancing cell adherence and biofilm formation to polypropylene and stainless steel surfaces by *S. aureus*. The temperature of 7 and 28°C were chosen regarding the usual temperature used to store pre-prepared meat products and the common temperature found in Brazilian Food Services, respectively. Some researchers have purposed that the use of liquid and/or solid food-based media as substrate for assessing the microbial growth (in planktonic or sessile form) may be useful for obtaining more realistic results than the use of laboratorial media when regarded a better feature of the nutrient availability in foods and their interaction with the surrounded environment (8).

Results of the kinetic of adhesion of *S. aureus* S3, S28 and S54 to polypropylene and stainless steel surfaces in meat-based broth at 7 and 28°C are shown in Figure 1. Highest numbers of adhered cells ($5 - 6 \log \text{cfu/cm}^2$) on polypropylene and stainless steel surfaces over 72 h were found for *S. aureus* S54 in all experimental systems. The counts of adhered cells of *S. aureus* S3 were around $5 \log \text{cfu/cm}^2$ over the evaluated times, while for *S. aureus* S28 were in a range of $4 - 5 \log \text{cfu/cm}^2$.

S. aureus S3 and S54 presented a similar pattern of adhesion with close bacterial counts over the three assessed time intervals. *S. aureus* S28 when incubated at both tested temperatures showed a clear two phase adhesion pattern on stainless steel coupons: an initial, when occurred an increasing number of adhered cells up to reach 5 and $5.9 \log \text{cfu/cm}^2$ at 7 and 28°C, respectively; followed for a decrease at 72 h (4.8 and $4.9 \log \text{cfu/cm}^2$ at 7 and 28°C, respectively). Herrera et al. (8) noted similar behavior in *S. aureus* growing in phosphate buffer solution (mimicking a nutrient-lacking media) over 25 h at 25°C. These findings suggest that under static conditions adherent cells may be present in high numbers, but do not always increase over time.

There was no significant influence ($p>0.05$) of the surface kind and incubation temperature on the adherence of *S. aureus* S3 and S54. For *S. aureus* S28 significant greater numbers ($p<0.05$) of adhered cells on stainless steel surfaces were found at 28°C in respect to 7°C. Otherwise, the number of adhered cells of *S. aureus* S28 on polypropylene did not differed ($p>0.05$) at 28 and 7 °C.

Herald and Zottola (7) noted that *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* adhered to stainless steel surfaces in greater numbers at 21 °C than at 30 °C. Rode et al. (30) found highest attachment capacity in *S. aureus* on polystyrene when cultivated in sub-optimal temperatures (20, 25 and 30 °C). On the other hand, Morton et al. (19) states that regardless of the specie or assayed surface, the adhesion occurs at maximum intensity when bacteria are

allowed to growth at their optimum temperature. It was observed for a marine bacterium, *Deleya mariana*, where maximum adhesion to a hydrophilic substratum was observed at 25 °C, its optimum temperature for growth, while the adhesion was smaller at 19 °C and 37 °C (26).

The kinetics of detachment of polypropylene and stainless steel surfaces for *S. aureus* S3, S28 and S54 under different experimental conditions are shown in Figure 2. The bacterial counts revealed a linear decrease in detachment rate over the contact sequence to the blot agar in all experimental systems. The cell detachment was of at least 10^3 cfu/cm² during the first 6 contacts (blot order) for the most systems, characterizing a high persistence over 72 h.

No significant influence ($p>0.05$) of the surface kind and incubation temperature was found for detachment rate of S28 and S54 over the evaluated times. Highest numbers ($p<0.05$) of detached cells of *S. aureus* S3 after 24 h of incubation was found for stainless steel at 7 °C, while after 48 and 72 h the highest counts ($p<0.05$) were found for polypropylene at 28 °C.

These findings about the cells detachment over a lot of contacts to a blot agar order reveal the high risk for dissemination of *S. aureus* in food processing plants throughout contaminated surfaces. A number of studies about the occurrence of selected pathogenic and spoilage microorganisms on food-contact surfaces reflect the importance of these environments in the route of cross-contamination in food services, mainly when applied inadequate procedures for cleaning and disinfection (18, 29).

Among the tested strains, *S. aureus* S3 was applied in assays of biofilm formation and sanitizers application. Levels of biofilm formation by *S. aureus* S3 on polypropylene and stainless surfaces over 15 days under different experimental conditions are showed in Figure 3. The results showed similar capability of biofilm formation when the strain was submitted to the different combinations of surface kinds and growth temperatures. For the most systems,

the maximum number of cells ($6 - 7 \log \text{ cfu/cm}^2$) was found after six days of incubation, followed for linear decrease over the remainder assessed times.

The bacterial counts indicated biofilm formation on both surfaces at 7 and 28°C already after 3 days. A number of viable cells from 10^5 to 10^7 cfu/cm^2 is needed for biofilm formation and lower values could indicate an adhesion process (25, 30). Highest intensity of biofilm formation on stainless steel and polypropylene surfaces was found at 28°C.

Marques et al. (17) studying the biofilm formation of *S. aureus* on stainless steel and glass surfaces immersed in BHI found a bacterial count of 10^7 and 10^8 cfu/cm^2 , respectively, after 15 days of incubation. Oulahal, Brice, Martial and Degraeve (22) assessing the survival of *S. aureus* on artificially contaminated stainless steel and polypropylene surfaces immersed in dairy products (skim milk pasteurized, raw milk and cheese curd) at 12°C and 25°C observed that the cells remained viable on the surfaces for 8 days. The authors suggested that the bacterial survival could be related to the possible formation of biofilm over the incubation time. Joseph et al. (13) studying the biofilm formation on stainless steel surfaces by *S. weltervereden* and *Salmonella* FCM40 found a population density of 10^6 cfu/cm^2 for both bacteria after 48 h.

Counts of *S. aureus* S3 adhered to polypropylene and stainless surfaces before and after application of peracetic acid and sodium hypochlorite are showed in Table 2. Log reduction caused by peracetic acid ranged of $2.6 - 3.7 \log \text{ cfu/cm}^2$, while for sodium hypochlorite was of $1.8 - 2.7 \log \text{ cfu/cm}^2$. However, in all experimental systems both tested sanitizers largely decreased ($p < 0.05$) the count of cells adhered to the assayed surfaces.

The electron microphotography of polypropylene and stainless steel surfaces after the application of the sanitizers sodium hypochlorite and peracetic acid are shown in Figure 4. The findings of electronic microscopy are in accordance with the results obtained in the

analysis of viable count cells on the surfaces when some remaining cells were found after applying peracetic acid (Figure 4 - B and E) and sodium hypochlorite (Figure 4 - C and F).

The American Public Health Association (APHA) recommends a maximum tolerated limit of 2 cfu/cm² (approximately 0.3 log cfu/cm²) in order to consider a food-contact surface appropriate, whereas the World Health Organization (WHO) suggests a limit of 30 cfu/cm² (approximately 1.48 log cfu/cm²) (17). Based on the obtained results, the sanitizers peracetic acid (30 ppm) and sodium hypochlorite (250 ppm) were not efficient in completely removing the cells of *S. aureus* adhered onto polypropylene and stainless steel surfaces. Residual cells adhered onto the surfaces after the sanitizers application reinforce the biofilm as high-source of cross contamination in food processing plants.

Even regarding the limitations of these study in assessing the adhesion, detachment and biofilm formation of a monospecie inoculum under static conditions, there are clear implications of our results for designing strategies to control the cross-contamination in food services because the strains used as test microorganisms were isolated directly from food-contact surfaces and the assays were carried out with materials (surfaces) commonly used in food processing when immersed in a food based media. These results encourage further researches focusing on the capacity of these strains to adhere, detach and form biofilm on surfaces of equipments and utensils used in food services under continuous flux, and the efficacy of different sanitization procedures on the decrease of cells in the biofilm matrix.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors are grateful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for the scholarship of the first author, and to CETENE (Centro de Tecnologia do Nordeste, Recife, Brazil) for the technical support in electronic microscopy analysis.

REFERENCES

1. Ammor, S.; Chevallier, I.; Laguet, A.; Labadie, J.; Tallon, R.; Dufour, E. 2004. Investigating of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 21:1-17.
2. Barnes, L.M.; Lo, M.F.; Adams, M.R.; Chamberlain, A.H.L. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4543–4548.
3. Braga, L.C.; Shupp, J.W.; Cummings, C.; Jett, M.; Takahashi, J.A.; Carmo, L.S.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A.M.A. 2005. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J. Ethnopharm.* 96:335-339.
4. Carpentier, B.; Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75:499-511.
5. Costerton, J.W.; Steward, P.S.; Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284:1318-1322.
6. Fux, C.A.; Wilson, S.; Stoodley, P. 2004. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in a in vitro catheter infection model. *J. Bacteriol.* 186:4486-4491.
7. Herald, P.J.; Zottola, E.A. 1988. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperature and pH values. *J. Food Prot.* 51:445-448.
8. Herrera, J.J.R.; Cabo, M.L.; González, A.; Pazos, I.; Pastoriza, L. 2007. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiol.* 24:585-591.

9. Hood, SK.; Zottola, 1995. Biofilms in food processing. *Food Cont.* 6:9-18.
10. Hussain, M.; Becker, K.; Von Eiff, C.; Peters, G.; Hermann, M. 2001. Analogs of the extracellular adherence protein (Eap) are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clinic. Diag. Lab. Immunol.* 8:1271-1276.
11. IAL - Instituto Adolfo Lutz. (1985), Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. Sao Paulo.
12. IAL – Instituto Adolfo Lutz. (2005), Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª Ed. Brasília, Ministério da Saúde.
13. Joseph, B.; Ottas, S.K.; Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 364-367.
14. Kumar, C.; Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 9-27.
15. Kuźman, L.; Różalski, M.; Walenka, E.; Różalska, H.; Wysokińska, H. 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. *Phytomedicine*.14:31-35.
16. Malheiros, P.S.; Passos, C.T.; Casarin, L. S.; Serraglio, L.; Tondo, E.C. 2010. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Cont.* 21: 298-301.
17. Marques, S.C.; Rezende, J.G.O.S.; Alves, L.A.F.; Silva, B.C.; Alves, E.; Abreu, L.R.; Piccoli, R.H. 2007. Formation of biofilm by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol.* 38:538-543.

18. Møretro, T.; Hermansen, L.; Holck, A.L.; Sidhu, M.S.; Rudi, K.; Langsrud, S. 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl. Environm. Microbiol.*, 69: 5648-5655.
19. Morton, L.H.G.; Greenway, D.I.A.; Gaylarde, C.C.; Surman, S.B. (1998). Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 41: 247-259.
20. Nostro, A.; Blanco, A.R.; Cannatelli, M.A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; ROCCARO, A.S; Alonzo, V. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230:191-195,
21. O'toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 49–79.
22. Oulahal, N.; Brice, W.; Martial, A. Degraeve, P. 2008. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products, *Food Cont.* 19:178–185.
23. Rapini, L. S.; Teixeira, J. P.; Martins, N. E.; Cerqueira, M. M. O. P.; Souza, M. R.; Penna, C. F. A. M. 2004. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. [Comunicação]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56: 130-133.
24. Rode, T.M.; Langsrud, S.; Holck, A.; Moretto, T. (2007), Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions, *Int. J. Food Microbiol.* 116: 372-383.
25. Ronner, A.B.; Wong, A.C.L. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *J. Food Prot.* 56:750-758.

26. Shea, C.; Nunley, J.W.; Williamson, J.C.; Smith-Sommerville, H.E. 1991. Comparison of the adhesion properties of *Deleria marina* and the exopolysaccharide-defective mutant strain DMR. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3107-3113.
27. Spoering, A.S.; Lewis, K. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobial. *J. Bacteriol.* 183:6746-6751.
28. Tremoulet, F.; Clement, E.; Gaillarde-Martinie, B.; Labadie, J. 2002. A potential new technique for studying biofilm growth and stress resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and other bacterial species in food plants. *Scie. Aliment.* 22:305-315.
29. Wirtanen, G.; Ahola, W.; Mattila-Sandholm, T. 1995. Evaluation of cleaning procedures in elimination of biofilm from stainless steel surface in process equipment. *Food Bioprod. Process.* 73: 9-16.
30. Zoltai, P.T.; Zottola, E.A.; McKay, L.L. 1981. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. *J. Food Prot.* 44: 204-208.

Table 1 - Physico-chemical characteristics of meat-based broth.

Physico-chemical parameters	Values
Acidity	2.83%
Protein	0.96%
Fat	0.33%
Moisture	97.96%
Carbohydrates	0.75%
Ashes	0.21%
pH (T: 25°C)	6.61

Table 2. Effect of peracetic acid (30 mg/L) and sodium hypochlorite (250 mg/L) on the count (Log cfu/cm²) of *S. aureus* S3 cells (grown in meat-based broth at 7 and 28°C) adhered onto polypropylene and stainless steel surfaces.

Sanitizers	Temperature	Control	Treated	Fraction reduction
<u>Polypropylene</u>				
Peracetic acid	7°C	6.1 ^a	2.4 ^b	3.7
	28°C	5.3 ^a	2.7 ^b	2.6
Sodium hypochlorite	7°C	6.1 ^a	4.3 ^b	1.8
	28°C	5.6 ^a	3.2 ^b	2.1
<u>Stainless steel</u>				
Peracetic acid	7°C	6.3 ^a	3.1 ^b	3.0
	28°C	2.8 ^b	2.8 ^b	2.8
Sodium hypochlorite	7°C	6.3 ^a	3.4 ^b	2.7
	28°C	3.2 ^b	3.2 ^b	2.4

Values followed for the same letters in each row differ significantly (p<0.05) according to the Student t test.

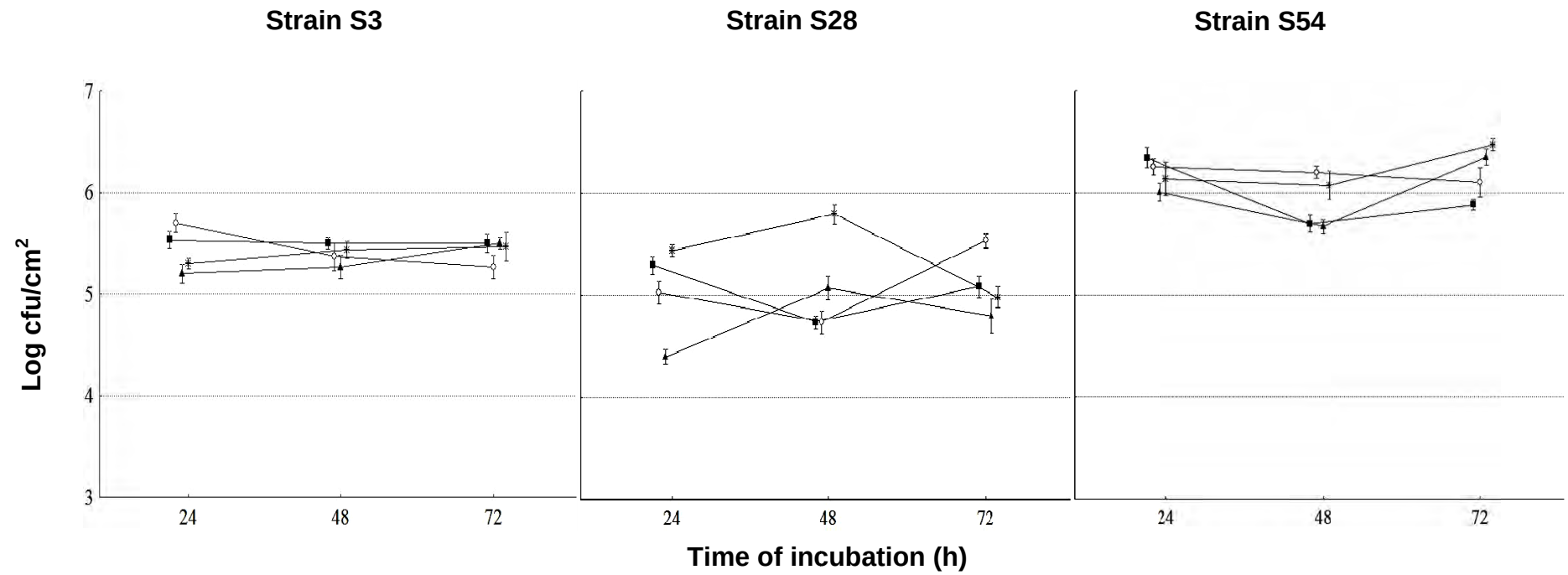


FIGURE 1. Kinetics of adhesion of strains S3, S28 and S54 to polypropylene and stainless steel surfaces in meat-based broth at 7 °C and 28°C (■: polypropylene 7°C, ○: polypropylene 28°C, ▲: stainless steel 7°C, ✱: stainless steel 28°C).

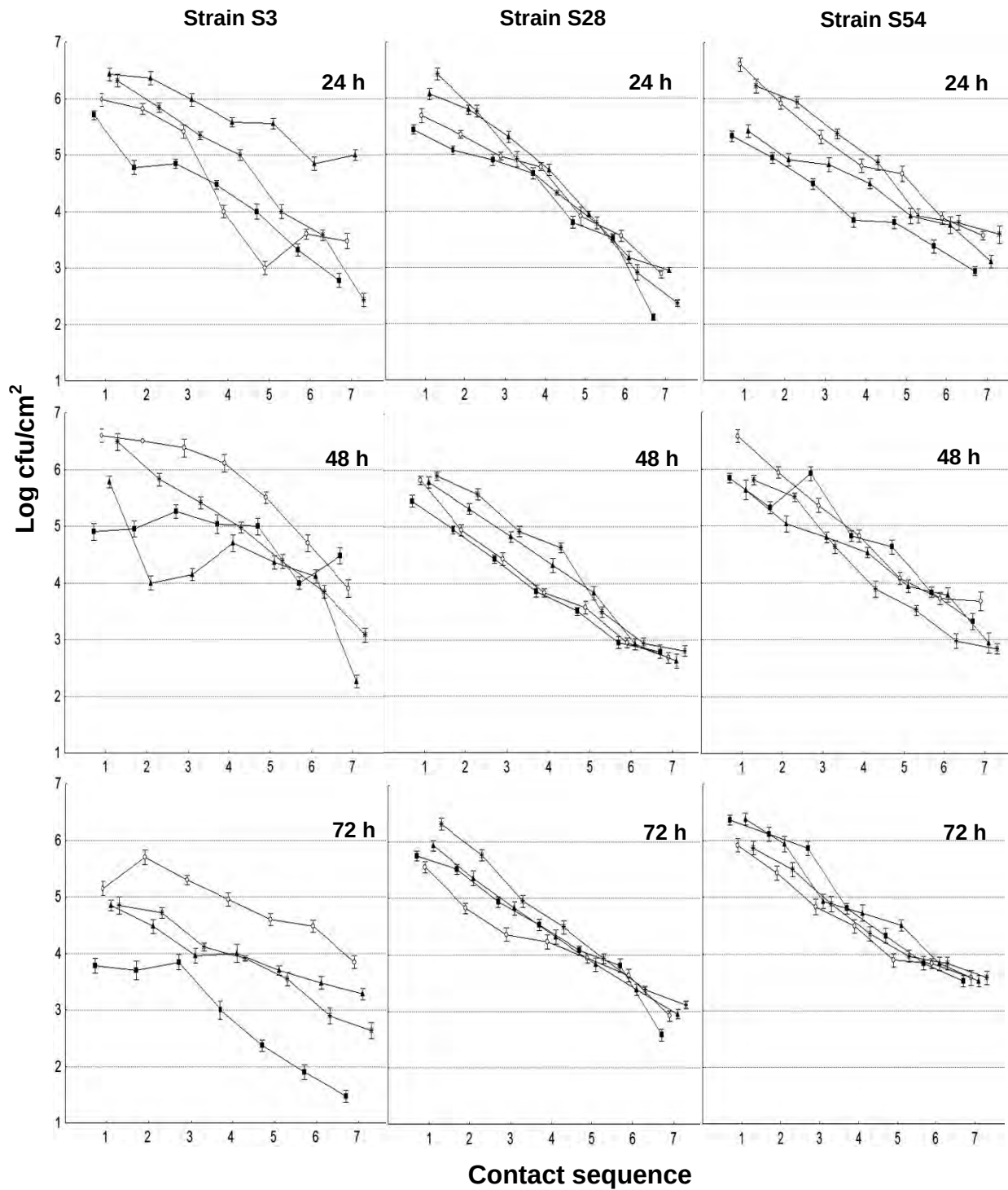


FIGURE 2. Kinetics of separation of strains S3, S28 and S54 after 24, 48 and 72 hours of polypropylene and stainless steel surfaces in meat-based broth at 7 °C and 28°C (■: polypropylene 7°C, ○: polypropylene 28°C, ▲: stainless steel 7°C, ✱: stainless steel 28°C).

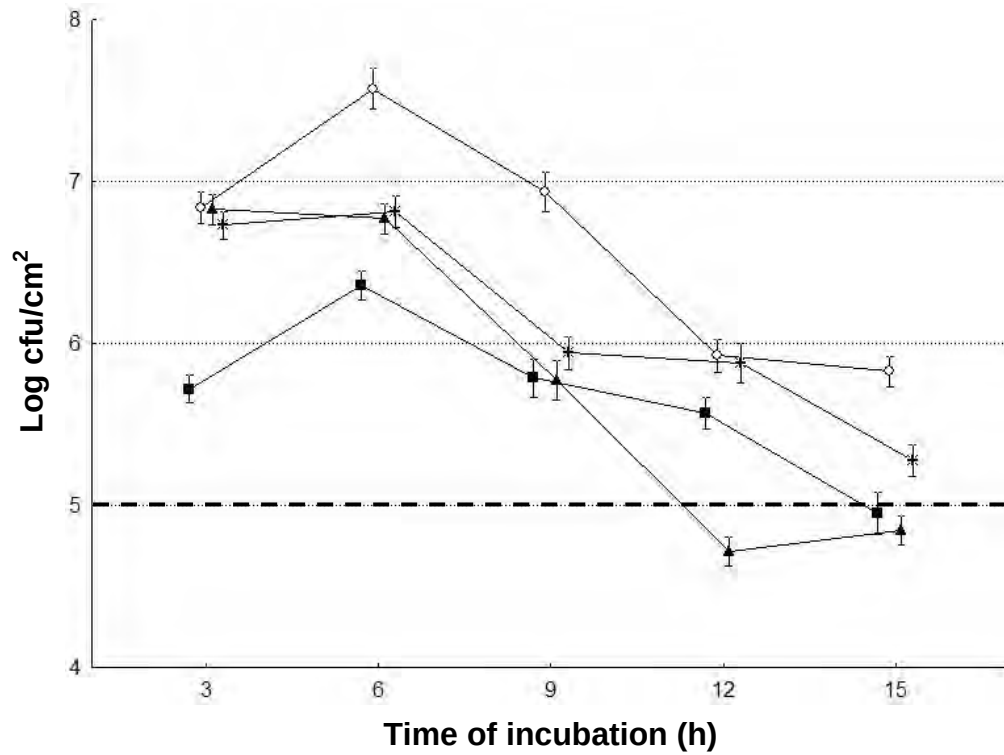


FIGURE 3. Biofilm formation by *S. aureus* S3 on polypropylene and stainless steel surfaces in meat-based broth at 7 °C and 28°C over 15 days of incubation (■: polypropylene 7°C, ○: polypropylene 28°C, ▲: stainless steel 7°C, ※: stainless steel 28°C). Dotted line means the lower bacterial count (cfu/cm²) needed for biofilm formation according to Ronner et al. (25) and Wirtanen et al. (29).

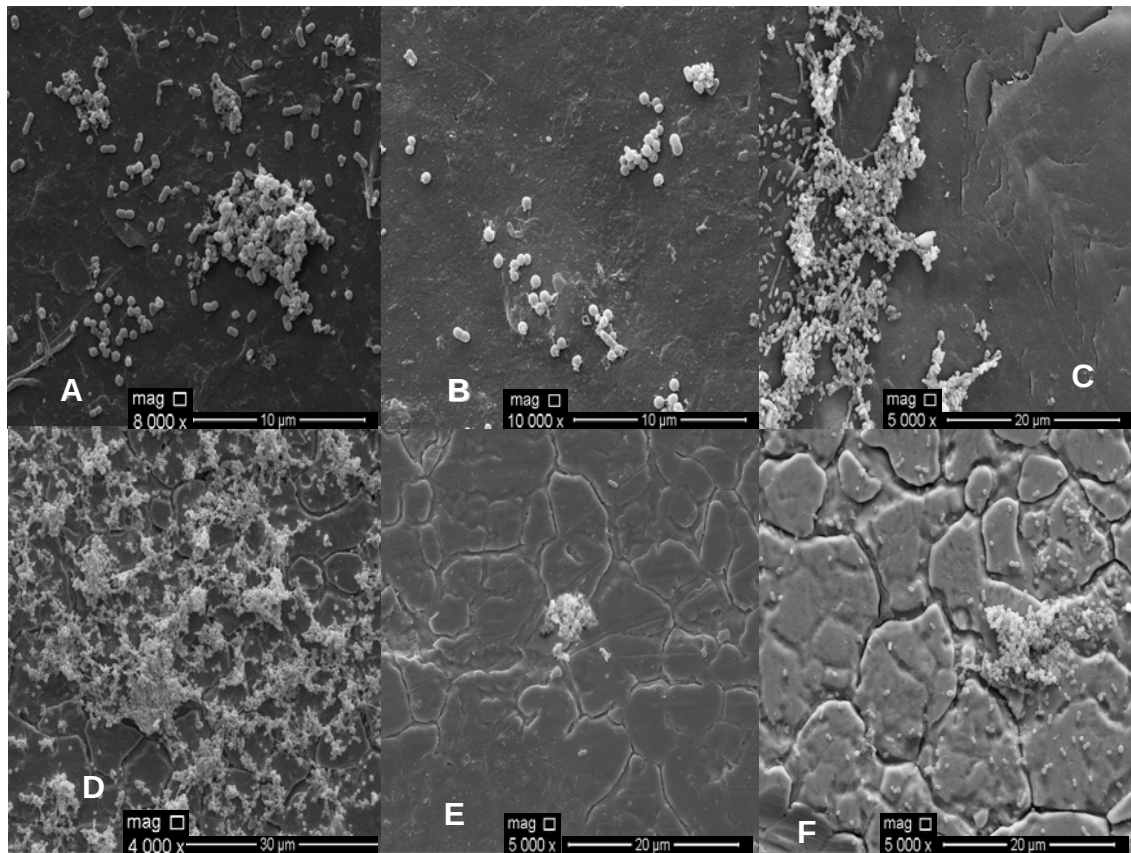


FIGURE 4. Scanning electronic microphotography of *S. aureus* S3 cells adhered on polypropylene (A, B, C) and stainless steel (D, E, F) when incubated in meat-based broth at 28 °C for 15 days, after the application of water (A, D - control), peracetic acid (B,E) and sodium hypochlorite (C, F). Different magnifications were used for better visualization.

ARTIGO 2

Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on polypropylene and stainless steel surfaces and sensitivity to sanitizers

Running title: Biofilm formation by *S. aureus* from food services

Quênia Gramile Silva Meira¹, Isabella de Medeiros Barbosa¹, Ana Júlia Alves Aguiar Athayde¹, José Pinto de Siqueira Júnior², Evandro Leite de Souza^{1*}

¹ Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Center of Health Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

² Laboratory of Genetics of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Center of Exact and Nature Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

*Author for correspondence: Evandro Leite de Souza
Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
Telefone: 83 3216 7807
Número de Fax: 83 3216 7094
E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

ABSTRACT

This study aimed to assess the capacity of adhesion, the kinetic of separation and biofilm formation of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from food services surfaces cultivated in a vegetable broth at 7 and 28°C, and the efficacy of peracetic acid (30 mg/L) and sodium hypochlorite (250 mg/L) in removing the bacterial cells in the biofilm. The strains adhered over 4 log cfu/cm² to stainless and polypropylene surfaces regardless the kind of surface and temperature of incubation. Cell detachment was about 10³ cfu/cm² in the first 6 contacts with agar characterizing a high persistence of cells on the tested surfaces. Number of cells (10⁵ – 10⁷ cfu/cm²) needed for biofilm formation was noted at all experimental systems already after 3 days. A range of 2.0 to 3.3 and 1.5 to 2.1 log cfu/cm² was observed in the reduction of cells in biofilm matrix caused by peracetic acid and sodium hypochlorite, respectively. From these results, the strains assayed revealed high capability to adhere and form biofilm on food contact surfaces.

Key words: *S. aureus*, surfaces, biofilm, cross contamination.

PRACTICAL APPLICATIONS

There are clear applications of this study for designing strategies to control the cross-contamination in food and nutrition services where is extremely necessary to identify the conditions under which *S. aureus* can survive and multiply in the environment of processing, storage and distribution of food. The strains of *S. aureus* assayed here revealed a prominent capability to adhere and form biofilm when exposed to different experimental conditions (surfaces kinds and growth temperatures), suggesting that the clumping phenotype of the tested strains did not suffer great influence of the surrounding environment. Moreover, the results obtained in this study present implications for the microbial safety of foods since the strains used as test microorganisms were isolated directly from food-contact surfaces and the assays of adherence and biofilm formation were carried out in materials (surfaces) commonly used in food processing when immersed in a food-based media.

INTRODUCTION

Worldwide there is concern about the impact of microbial foodborne diseases on the human behalf (WHITE et al., 2002; FAUSTINO et al., 2007). The importance of contaminated surfaces in spreading pathogenic microorganisms to foods is already well established in food processing, catering and domestic environment (VASSEUR et al. 2001; VATOUR et al., 2008). One of the most common ways for bacteria to live is adhering onto surfaces and forming organized communities named biofilms (JENKINSON, LAPPIN-SCOTT, 2001; MALHEIROS et al., 2009).

Stainless steel, glass, rubber and polypropylene surfaces can be contaminated either by spoilage or pathogenic bacteria, which under certain conditions adhere to these surfaces, initiating the cell growth and leading to biofilm formation (MURGA et al., 2001).

According to Costerton et al. (1999) biofilms are cell aggregates embedded in an organic extracellular polymeric matrix that confers resistance to involved microorganisms. Bacteria aggregated to form biofilms have greater resistance to the environmental stress than the planktonic counterparts dispersed in the environment, including the sensitivity to sanitizers (SPOERING, LEWIS, 2001; FUX, WILSON, STOODLEY, 2004). Bacterial aggregates detached from biofilms retain the high level of resistance to antimicrobials and may contain enough number of cells to represent a potential infectious dose. The formation of biofilms on food contact surfaces is known as a potential risk to the consumer's health, particularly, if the cross contamination of food occurs after a bactericidal procedure (SPOERING, LEWIS, 2001; FUX, WILSON, STOODLEY, 2004).

Staphylococcus aureus has been frequently found in surfaces of food processing plants and recognized as being responsible for outbreaks related to the consumption of fresh and processed foods worldwide (BALABAN, RASOOLY, 2000; BRAGA et al., 2005; NOSTRO et al., 2004). The establishment of the food poisoning caused by *S. aureus* depends on the ability of the strain to survive in a colonized substrate, multiply under a variety of conditions and produce several extracellular substances (PASTORIZA et al., 2002).

Currently, there is a lack of information about the capacity of *S. aureus* isolated from food service surfaces of adhering and forming biofilm when exposed to different environmental conditions, as well as about the efficacy of sanitizers in removing the cells forming the biofilm. Regarding these aspects, this study was

carried out with the aim of evaluating the ability of *S. aureus* isolated from food services surfaces to adhere and form biofilms on stainless steel and polypropylene surfaces when cultivated in a vegetable-based broth under different temperatures. Still, it was observed the effect of the sanitizers peracetic acid and sodium hypochlorite in reducing the number of viable cells on a preformed biofilm.

MATERIALS AND METHODS

Test strains

S. aureus S3, *S. aureus* S28 and *S. aureus* S54 obtained from the Microorganism Collection, Laboratory of Food Microbiology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil were used as test microorganisms. These strains were isolated from different surfaces of Food and Nutrition Services by the standard procedures. Stock cultures were kept on Nutrient Agar – NA (Difco, Brazil) slants under refrigeration ($7 \pm 1^\circ\text{C}$).

Inocula used in antimicrobial assays were obtained from overnight cultures grown on NA slants at 37°C . A loopfull of the culture was diluted in sterile saline solution (0.85 g/100mL) to have a final concentration of approximately 10^8 colony forming unity per mL (cfu/mL) adjusted according to the turbidity of 0.5 McFarland standard tube.

Test surfaces and experimental conditions

AISI 304 stainless steel (2 x 2 x 0.2 cm) and polypropylene coupons (2 x 2 x 0.4 cm) were used as test surfaces. The coupons were individually cleaned, sanitized and sterilized according to procedure described by Marques et al. (2007).

The adherence, detachment and biofilm formation of test strains on polypropylene and stainless steel surfaces when inoculated in a vegetable-based broth was assessed in two different incubation temperatures, 7 and 28°C .

Preparation of vegetable-based broth

A mixture (1:1:1) of vegetables (carrot, lettuce and tomato) containing 300 g was mashed with 600 mL of distilled water using a domestic blender and vacuum filtered using Whatman no.1 filter paper. The material was sterilized by filtration using a Millipore 0.45 μm . The obtained broth was stored at -20°C in aliquots of 50 mL, and when required one aliquot was thawed under refrigeration ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) and used for the experimental assays.

The vegetable broth was characterized regarding its physico-chemical characteristics (acidity, moisture, protein, fat, carbohydrate, mineral content and pH value) according to procedures described by IAL (2005). Physico-chemical characteristics of the vegetal-based broth used in the assays are shown in Table 1.

Adhesion to surfaces and quantification of adhered cells

An aliquot of 100 μL of the growth media was plated onto the centre of each coupon. After that, an aliquot of 50 μL of the bacterial inocula was added to and mixed with the growth media, followed for incubation under the pre-established temperatures. After 24, 48 and 72 h of incubation, coupons (two for each treatment) were immersed in sterile peptone water - SPW (0.85 g/100mL) during 15 s for releasing non-adhered cells. The cells adhered to the coupons were collected by thoroughly rubbing their surfaces with two moistened swabs, which were resuspended in SPW by vigorously vortexing for 30 s. The mixture was serially

diluted (10^{-1} - 10^{-5}) in SPW and aliquots of 100 μ L were spread plated onto sterile Nutrient Agar (NA) plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C (HERRERA et al, 2007; RODE et al, 2007). After the incubation period, the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm².

Kinetic separation

An aliquot of 300 μ L of the growth media was plated onto the centre of each coupon. After that, an aliquot of 150 μ L of the bacterial inocula was added to and mixed with the growth media, followed for incubation under the pre-established temperature. After 24, 48 and 72 h of incubation, coupons (two for each treatment) were immersed in SPW during 15 s for releasing non-adhered cells. After that, each coupon was placed on a sterile NA plate, and after 2 min, removed and placed onto a second sterile NA plate. This procedure was repeated through 7 sterile NA plates. The number of detached cells on the NA plates with order number of 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 was found by transferring the agar blotting from each plate to 10 mL of SPW followed by blending using a Stomacher. The mixture was serially diluted (10^{-1} – 10^{-5}) in SPW and aliquots of 100 μ L were spread plated onto NA plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C (HERRERA et al., 2007). After the incubation period the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm².

Biofilm development and quantification

The level of biofilm formation by *S. aureus* S3 on polypropylene and stainless surfaces over 15 days when incubated in vegetable broth at 7°C and 28°C was assessed. For this, five stainless and five polypropylene coupons were immersed in a sterile Petri dish containing 20 mL of the growth media and 2 mL of the bacterial inoculum. The dishes were sealed and incubated statically at the pre-established temperatures. After 3, 6, 9, 12 and 15 days of incubation, the coupons were withdrawn and washed with SPW to remove the non-adhered cells. Once again, the coupons were immersed in a fresh medium containing the same amount of inoculum, being the process repeated for four times, completing a 15-day period.

At each incubation interval, two coupons of each treatment were submitted to bacterial count in biofilm matrix. For this, the biofilm was scraped with two moistened sterile swabs, which were resuspended in 9 mL of SPW by vortexing for 15 s. Serial dilutions were prepared in SPW and aliquots of 100 μ L were spread plated onto sterile NA plates, followed for incubation at 37°C for 24 h (MARQUES et al., 2007). After the incubation period, the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm².

Sanitizer application

The efficacy of the sanitizers sodium hypochlorite (250 mg/L) and peracetic acid (30 mg/L) in removing the cells of *S. aureus* S3 in the biofilm matrix when grown in vegetable-based broth at 7 and 28°C was assessed. For this, five coupons were permitted to develop biofilm according to the experimental conditions before cited. After 15 days of incubation, the coupons were washed in SPW, immersed for 30 s in sterile Petri dishes containing 20 mL of the sanitizer solution. Afterwards, the coupons were drawn of the sanitizer solution and immersed for 3 s in a neutralizing solution (0.1 M Na₂S₂O₃). The remaining cells were counted after scraping by the use of two sterile moistened swabs, which were resuspended by vigorously vortexing in 9 mL of SPW. Serial dilutions were prepared in SPW and aliquots of 100 μ L were spread plated onto NA plates and incubated at 37°C for 24 h (AMMOR et al., 2004;

MARQUES et al., 2007). After the incubation period, the number of viable cells was counted and the results expressed in cfu/cm². In control assays, the solutions of sanitizers were replaced by sterile distilled water. The efficiency of each sanitizer was calculated regarding the difference between the counts obtained for the control surfaces and for the surfaces submitted to the sanitizers application.

Procedures for scanning electron microscopy

Samples submitted to biofilm formation on polypropylene and stainless steel surfaces at 28°C according to the procedure before cited and after exposition to the sanitizers or distilled water were observed for remaining of viable cells in biofilm matrix using scanning electron microscopy. For this, the coupons were initially immersed in were pre-fixed with 2% glutaraldehyde for 2h at 4 °C. Post fixation was carried out using a 2 % osmium tetroxide solution for 30 min at 30 °C. After each fixation the cells were washed twice with PBS, dried at a critical point in liquid CO₂ under 95 bar pressure and then gold covered (Fine coat ion sputter JFC-1100, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Finally, the cells were examined with a scanning electron microscope (FEI QUANTA 200F) as previously described (ZOLTAI et al., 1981; KUMAR et al., 1998; MARQUES et al., 2007).

Statistical analysis

Counts were converted to decimal logarithmic values (log cfu/cm²) to nearly match the assumption of a normal distribution. The obtained values for adhesion, detachment and biofilm formation were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan test to determine significance influence of the incubation temperature and contact surface. The counts obtained for the effect of the sanitizers (before and after the application) on the biofilm matrix were compared using paired Student's t-test. Data were analyzed using the software Statistica 7. A probability value $p < 0.05$ was accepted as indicating significant difference.

RESULTS AND DISCUSSION

The number of adhered cells of *S. aureus* S3, S28 and S54 to polypropylene and stainless steel surfaces under different experimental conditions over 72 h of incubation is shown in Figure 1. Regarding that the substrate and extrinsic characteristics have been reported to influence the bacterial adherence, a food based media (vegetable-based broth) and two incubation temperatures (7 and 28°C) were tested in respect of enhancing cell adherence and biofilm formation to polypropylene and stainless steel surfaces in this study. The temperature of 7 and 28°C were chosen regarding the common temperature used to store pre-prepared vegetable products and the usual temperature found in Brazilian Food and Nutrition Services, respectively. Using liquid and/or solid food-based media as substrate for assessing the microbial growth (in planktonic or sessile form) may be useful for obtaining more realistic results than the use of laboratorial media when regarded a better feature of the nutrient availability in foods and their interaction with the surrounded environment (Herrera et al., 2007).

The highest numbers of adhered cells on polypropylene and stainless steel surfaces were found for *S. aureus* S54 in all experimental conditions. S54 showed an initial decline in number of adhered cells on polypropylene surface at 28°C after 48 h of incubation, followed by an increase after 72 h. *S. aureus* S3 showed a number of

adhered cells around 5 log cfu/cm² over the assessed incubation periods, except on stainless steel surfaces at 28°C when counts were around 4.5 log cfu/cm².

The number of adhered cells of *S. aureus* S28 showed two different phases: an initial, with the number of adhered cells on polypropylene and stainless steel surfaces ranged from 4.6 to 5.8 log cfu/cm² and 4.1 to 5.0 log cfu/cm², respectively, after 24 and 48 h of incubation; and a second comprising 48 to 72 h of incubation, at which cell counts decreased from 5.8 to 5.4 log cfu/cm² and 5.0 to 3.9 log cfu/cm².

Herrera et al. (2007) noted similar behavior in *S. aureus* when inoculated in phosphate buffer solution (mimicking a nutrient-lacking media) over 25 h at 25 °C. The results of the present study tend to agree with these findings which suggest that under static conditions adherent cells may be present in high numbers, but do not always increase over the incubation time. According to Stoodley et al. (2002) this behavior could be related with the process of cell division and/or redistribution of adhered cells forming the biofilm (STOODLEY et al, 2002; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

There was no clear influence of the surface kind and incubation temperature on the adherence of the three tested strains. For *S. aureus* S3 highest numbers ($p < 0.05$) of adhered cells was found on polypropylene at both tested temperatures in comparison to stainless steel. For *S. aureus* S28, highest numbers ($p < 0.05$) of adhered cells were found in polypropylene at 28°C and stainless at 7°C.

Malheiros et al. (2010) in assays of adherence of *S. aureus* on polyethylene and stainless steel surfaces noted significant increase ($p < 0.05$) in counts of adhered cells at 20°C in comparison to lower temperatures of incubation (7, 10, 12 and 15°C). Otherwise, other previous studies found increasing effect of lower temperature on the adhesion capacity of food-related microorganisms, including *S. aureus*. Herald and Zottola (1988) noted that *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* adhered to stainless surfaces in greater number at 21°C than at 30°C. Rode et al. (2007) noted highest attachment capacity in *S. aureus* on polystyrene when cultivated in sub-optimal temperatures (20, 25 and 30°C). Morton et al. (1998) states that regardless of the specie or surface assayed, the adhesion process occurs at maximum intensity when bacteria are kept next to or at their optimum growth temperature.

The kinetics of detachment from polypropylene and stainless steel surfaces for *S. aureus* S3, S28 and S54 at 7 and 28°C are shown in Figure 2. Bacterial counts revealed linear decrease in detachment rate over the contact sequence in all experimental systems. For the most systems detached cells were around 10³ log cfu/cm² over the first six contacts with the agar revealing a high persistence on surfaces over 72 h. In general, no significant influence ($p > 0.05$) of the surface kind and incubation temperature was noted for detachment rate of the tested strains. These data about the detachment of *S. aureus* over a lot of contacts to a blot agar suggest a high risk source for cross contamination of foods as they passes the contaminated surfaces.

According to Heydorn et al. (2000) and Cheng et al. (2007) the maturation of the biofilm occurs between three to six days after the initial adhesion and only after 10 days an increased population density with pronounced production and deposition of exopolysaccharide is reached (mature biofilm). Levels of biofilm formation by *S. aureus* S3 on polypropylene and stainless surfaces over 15 days at 7 and 28°C are shown in Figure 3.

The results showed a similar capacity for biofilm formation when *S. aureus* S3 was submitted to the different combinations of surface kind and growth

temperature. The obtained counts indicated biofilm formation on polypropylene and stainless steel surfaces at 7 and 28 °C already after 3 days of incubation. The maximum number of cells ($5.5 - 5.8 \log \text{cfu/cm}^2$) was found after six days, excepting on polypropylene at 7°C. For the most systems, the number of viable cells in the biofilm matrix followed a linear decrease after 6-day incubation. Highest intensity of biofilm formation on stainless steel and polypropylene was found at 28°C.

Ronner et al. (1993) and Wirtanen et al. (1995) state that a minimum of $10^5 - 10^7 \text{cfu/cm}^2$ is needed for the formation of biofilm, and lower counts could indicate only an adhesion process. The literature about the biofilm formation by *S. aureus* on polypropylene and stainless steel surfaces is still scarce becoming difficult to make an extensive comparative discussion of the obtained results. Marques et al. (2007) studying the biofilm formation by *S. aureus* on stainless steel and glass surfaces immersed in Brain Heart Infusion broth found bacterial count of 10^7 and 10^8cfu/cm^2 , respectively, after 15 days. Fuster-Valls et al (2008) evaluating the effect of different environmental conditions on the survival of *S. aureus* on stainless steel surfaces found counts of 10^5cfu/cm^2 after 24 h. Ortega et al (2010) evaluating the adhesion capacity of *E. coli* on stainless steel found a number of cells adhered to the surface ranging from 10^3 to 10^4cfu/cm^2 .

Counts of *S. aureus* S3 cells adhered to polypropylene and stainless surfaces before and after application of peracetic acid (30 mg/L) and sodium hypochlorite (250 mg/L) are shown in Table 2. When compared both sanitizers, peracetic acid was found as the most effective in reducing the viable cell count in the biofilm matrix. Log reduction caused by peracetic acid ranged from 2.0 to 3.3 $\log \text{cfu/cm}^2$, while for sodium hypochlorite it was from 1.5 to 2.1. However, in all experimental systems both tested sanitizers largely decreased ($p < 0.05$) the counts of cells adhered to the assayed surfaces in comparison to the control assay.

The electron microphotography of polypropylene and stainless steel surfaces after the application of the sanitizers sodium hypochlorite and peracetic acid is shown in Figure 4. It might be observed that the findings of electronic microscopy are in accordance with the results obtained in the analysis of viable cell count on the tested surfaces when some remaining cells were found after applying peracetic acid (B, E) and sodium hypochlorite (C, F).

The American Public Health Association (APHA) recommends a maximum tolerated limit of 2cfu/cm^2 in order to consider a food contact surface appropriate, whereas the World Health Organization (WHO) suggests such limits as being 30cfu/cm^2 (MARQUES et al, 2009). Based on the obtained results, peracetic acid (30 mg/L) and sodium hypochlorite (250 mg/L), under the conditions used in this study, were not efficient in completely removing the viable cells of *S. aureus* forming a biofilm on polypropylene and stainless steel surfaces.

Even regarding the limitations of this study in assessing the adhesion, detachment and biofilm formation of a monospecies inoculum under static condition, it could be concluded that the assayed strains of *S. aureus* presented highlighted capacity to adhere and form biofilm on stainless steel and polypropylene surfaces when immersed in a food-based broth. Moreover, the sanitizers peracetic acid and sodium hypochlorite were not efficient in providing total removal of the viable cells of *S. aureus* forming a mature biofilm. These results encourage further researches focusing on the capability of *S. aureus* to adhere, detach and form biofilm on surfaces of equipment and utensils used in food and nutrition services and the efficacy of classical and alternatives sanitizers to reduce the number of cells in the biofilm matrix.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors are grateful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for the scholarship of the first author, and to CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Brazil) for the technical support in electronic microscopy analysis.

REFERENCES

- AMMOR, S., CHEVALLIER, I., LAGUET, A., LABADIE, J., TALLON, R. and DUFOUR, E. 2004. Investigating of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 21, 1-17.
- BALABAN, M.S. and RASOOLY, A. 2000. *Staphylococcal* enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1-10.
- BRAGA, L.C., SHUPP, J.W., CUMMINGS, C., Jett, M., TAKAHASHI, J.A., CARMO, L.S.; CHARTONE-SOUZA, E. and NASCIMENTO, A.M.A. 2005. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J. Ethnopharm.* 96, 335-339.
- CHENG, G., ZHANG, Z., CHEN, S., BRYERS, J. D. and JIANG, S. 2007. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials.* 28, 4192-4199.
- COSTERTON, J.W., STEWARD, P.S. and GREENBERG, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284, 1318-1322.
- FAUSTINO, J.S., PASSOS, E.C., MELLO, A.R.P., ARAÚJO, L.M., SOUZA, C.V., JORGE, L.I.F., and ZAMARIOLI, L.A. 2007. Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000 – 2006. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 66: 26-30.
- FUSTER-VALLS, N., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., MARÍN-De-MATEO, M. and RODRÍGUES-JEREZ, J.J. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless surfaces. *Food Cont.* 19, 308-314.
- FUX, C.A., WILSON, S. and STOODLEY, P. 2004. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in a in vitro catheter infection model. *J. Bacteriol.* 186, 4486-4491.
- HERALD, P.J. and ZOTTOLA, E.A. 1988. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperature and pH values. *J. Food Prot.* 51, 445-448.
- HERRERA, J.J.R., CABO, M.L., GONZÁLEZ, A., PAZOS, I. and PASTORIZA, L. 2007. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiol.* 24, 585-591.
- HEYDORN, A., NIELSEN, A.T., HENTZER, M., STERNBERG, C., GIVSKOV, M., ERSBOLL, B. K. and MOLIN, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 146, 2395-2407.
- IAL – Instituto Adolfo Lutz. 2005. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª Ed. Brasília, Ministério da Saúde.
- JENKINSON, H. F. and LAPPIN-SCOTT, H. M. 2001. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol.* 9, 9-10.
- KUMAR, C. and ANAND, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 9-27.

- KUSUMANINGRUM, H.D., RIBOLDI, G., HAZELEGER, W.C. and BEUMER, R.R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 227-236.
- MALHEIROS, P.S., PASSOS, C.T., CASARIN, L. S., SERRAGLIO, L. and TONDO, E.C. 2010. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Cont.* 21, 298-301.
- MARQUES, S.C., REZENDE, J.G.O.S., ALVES, L.A.F., SILVA, B.C., ALVES, E., ABREU, L.R. and PICCOLI, R.H. 2007. Formation of biofilm by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol.* 38, 538-543.
- MORTON, L.H.G., GREENWAY, D.I.A., GAYLARDE, C.C. and SURMAN, S.B. 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 41, 247-259.
- MURGA, R., FOSTER, T.S., BROWN, E., PRUCKLER, J.M., FIELDS, B.S. and DONLAN, R.M. 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiol.* 147, 3121-3126.
- NOSTRO, A., BLANCO, A.R., CANNATELLI, M.A., ENEA, V., FLAMINI, G., MORELLI, I., ROCCARO, A.S and ALONZO, V. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 191-195.
- ORTEGA, M. P., HAGIWARA, T., WATANABE, H. and SAKIYAMA, T. 2010. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. *Food Cont.* 21, 573-578.
- PASTORIZA, L., CABO, M.L., BERNÁRDEZ, M., SAMPEDRO, G. and HERRERA, J.R. 2002. Combined effects of modified atmospheres packaging and lauric acid on the stability of pre-cooked fish products during refrigerated storage. *Eur. Food Res. Tech.* 215, 189-193.
- RODE, T.M., LANGSRUD, S., HOLCK, A. and MORETTO, T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 372-383.
- SPOERING, A.S. and LEWIS, K. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobial. *J. Bacteriol.* 183, 6746-6751.
- STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D. G. and COSTERTON, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Ann. Rev. of Microbiol.* 56, 187-209.
- VASSEUR, C., RIGAUD, N., HÉBRAUD, M. and LABADIE, J. 2001. Combined effects of NaCl, NaOH, and biocides (monolaurin and lauric acid) on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. *J. Food Prot.* 64, 1442-1445.
- VAUTOR, E., ABADIE, G., PONT, A. and THIERY, R. 2008. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animal species. *Veter. Microbiol.* 127, 407-411.
- WIRTANEN, G.; AHOLA, W.; MATTILA-SANDHOLM, T. 1995. Evaluation of cleaning procedures in elimination of biofilm from stainless steel surface in process equipment. *Food Bioprod. Process.* 73, 9-16.
- WHITE, D.G., ZHAO, S., SIMJEE, S., WAGENR, D.D. and MCDERMOTT, P.F. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microb. Infect.* 4, 405-412.
- ZOLTAI, P.T., ZOTTOLA, E.A. and MCKAY, L.L. 1981. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. *J. Food Prot.* 44, 204-208.

TABLE 1.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF VEGETABLE-BASED BROTH

Physico-chemical parameters	Values
Acidity	0.89%
Proteins	0.18%
Fat	0.11%
Moisture	98.32%
Carbohydrates	1.39%
Ashes	-
pH (T: 27,5°C)	5.69

TABLE 2.

EFFECT OF PERACETIC ACID (30 MG/L) AND SODIUM HYPOCHLORITE (250 MG/L) ON THE COUNT (LOG CFU/CM²) OF *S. AUREUS* S3 CELLS (GROWN IN VEGETABLE-BASED BROTH AT 7 AND 28°C) ADHERED ONTO POLYPROPYLENE AND STAINLESS STEEL SURFACES.

Sanitizers	Temperature	Control	Treated	Fraction reduction
<u>Polypropylene</u>				
Peracetic acid	7°C	4,9 ^a	2,2 ^b	2,7
	28°C	5,1 ^a	1,8 ^b	3,3
Sodium hypochlorite	7°C	4,9 ^a	3,4 ^b	1,5
	28°C	5,1 ^a	3,2 ^b	1,9
<u>Stainless steel</u>				
Peracetic acid	7°C	5,2 ^a	2,9 ^b	2,3
	28°C	5,9 ^a	3,9 ^b	2,0
Sodium hypochlorite	7°C	5,2 ^a	3,1 ^b	2,1
	28°C	5,9 ^a	4,1 ^b	1,8

Values followed for the same letters in each row differ significantly (p<0.05) according to the Student t test.

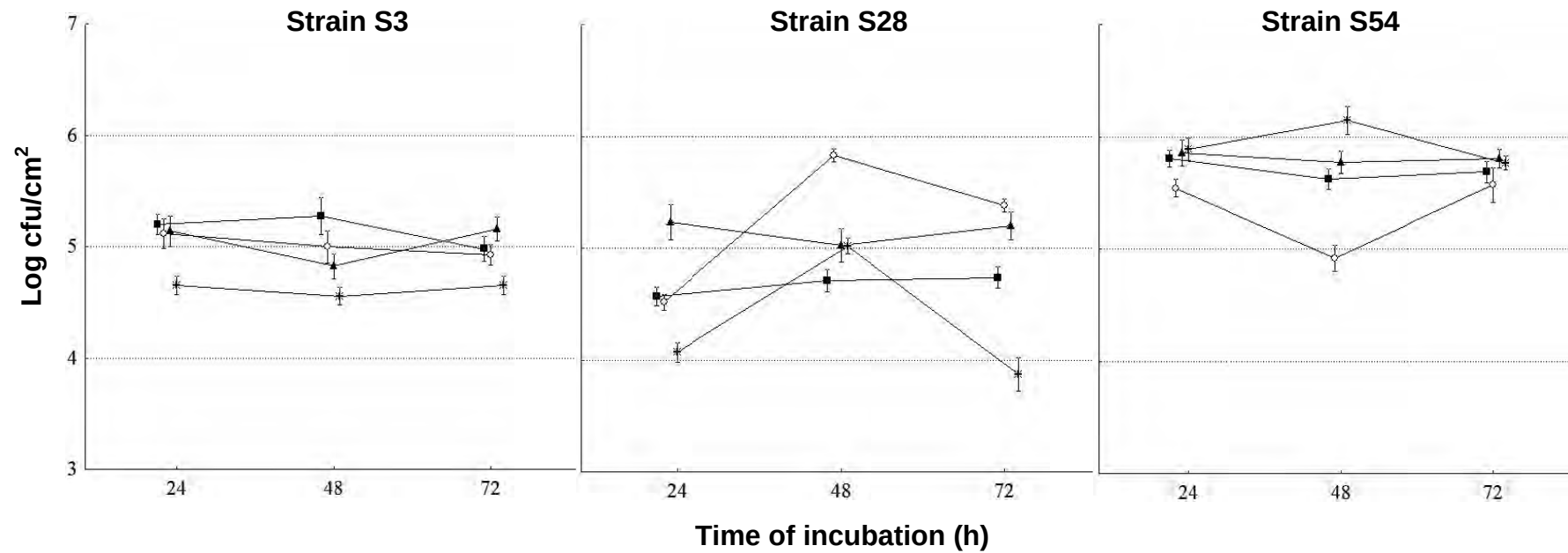


FIGURE 1.

KINETICS OF ADHESION OF STRAINS *S. aureus* S3, S28 AND S54 TO POLYPROPYLENE AND STAINLESS STEEL SURFACES IN VEGETABLE-BASED BROTH AT 7 °C AND 28°C (■: POLYPROPYLENE 7°C, ○: POLYPROPYLENE 28°C, ▲: STAINLESS STEEL 7°C, *: STAINLESS STEEL 28°C)

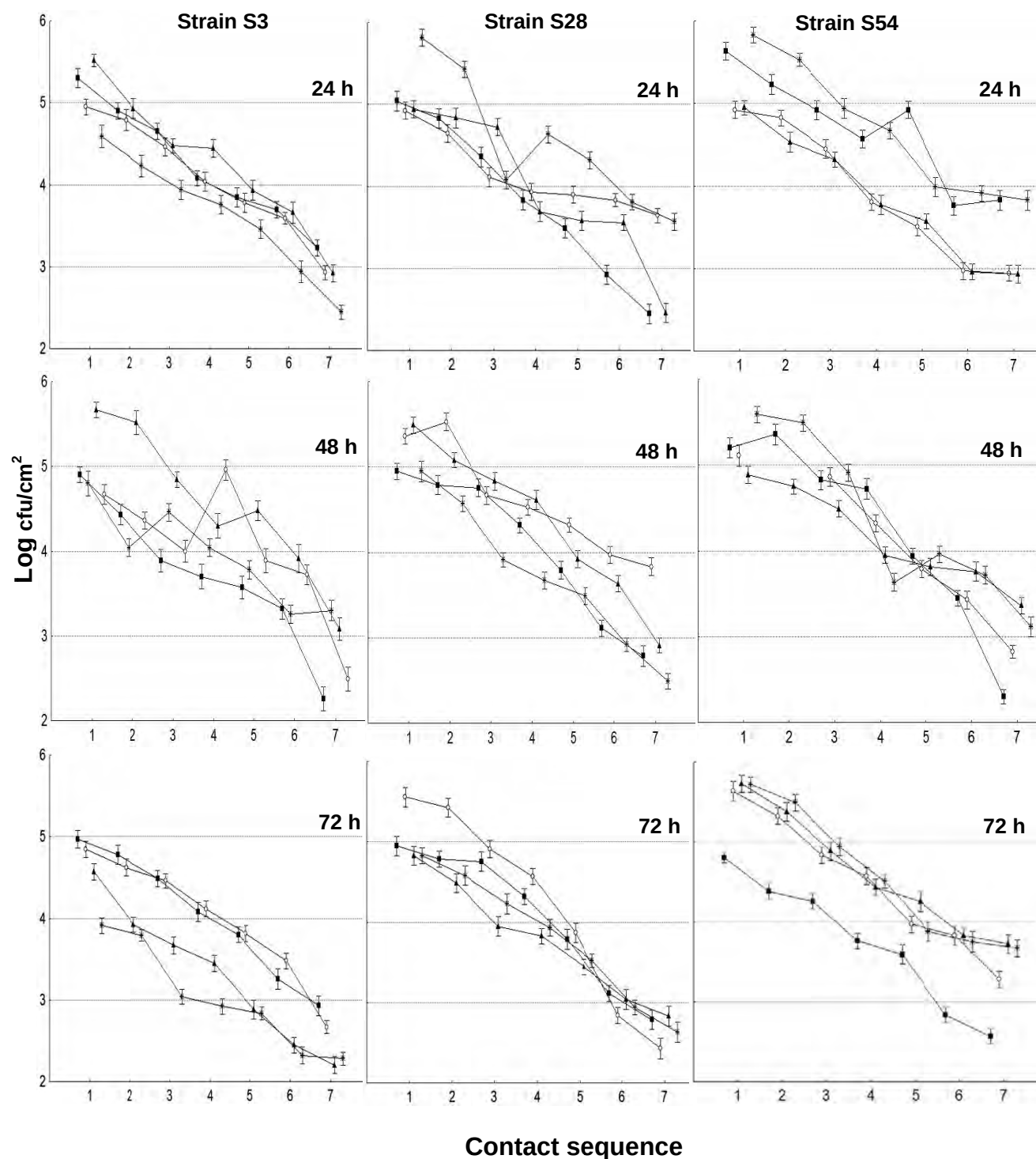


FIGURE 2.

KINETICS OF SEPARATION OF *S. aureus* S3, S28 AND S54 AFTER 24, 48 AND 72 HOURS OF POLYPROPYLENE AND STAINLESS STEEL SURFACES IN VEGETABLE-BASED BROTH AT 7 °C AND 28°C (■: POLYPROPYLENE 7°C, ○: POLYPROPYLENE 28°C, ▲: STAINLESS STEEL 7°C, ✱: STAINLESS STEEL 28°C)

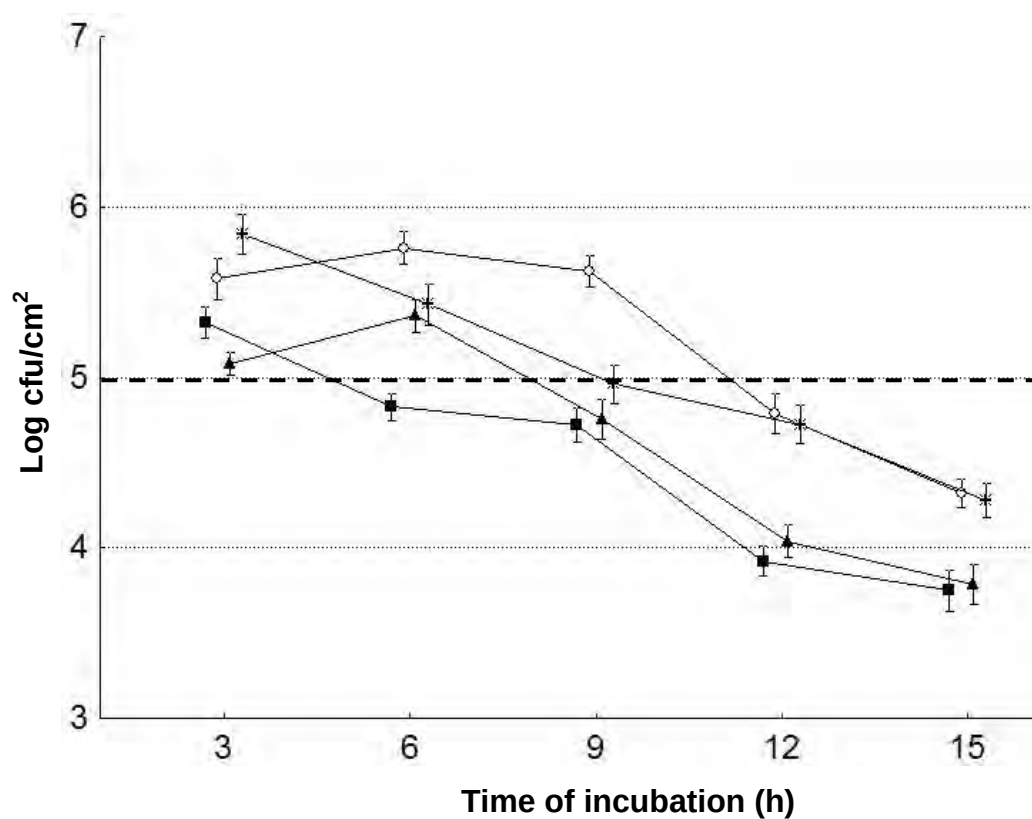


FIGURE 3.

BIOFILM FORMATION BY *S. aureus* S3 ON POLYPROPYLENE AND STAINLESS STEEL SURFACES IN VEGETABLE-BASED BROTH AT 7°C AND 28°C OVER 15 DAYS OF INCUBATION (■: POLYPROPYLENE 7°C, ○: POLYPROPYLENE 28°C, ▲: STAINLESS STEEL 7°C, *: STAINLESS STEEL 28°C). DOTTED LINE MEANS THE LOWER BACTERIAL COUNT (CFU/CM²) NEEDED FOR BIOFILM FORMATION ACCORDING TO Wirtanen et al. (28)

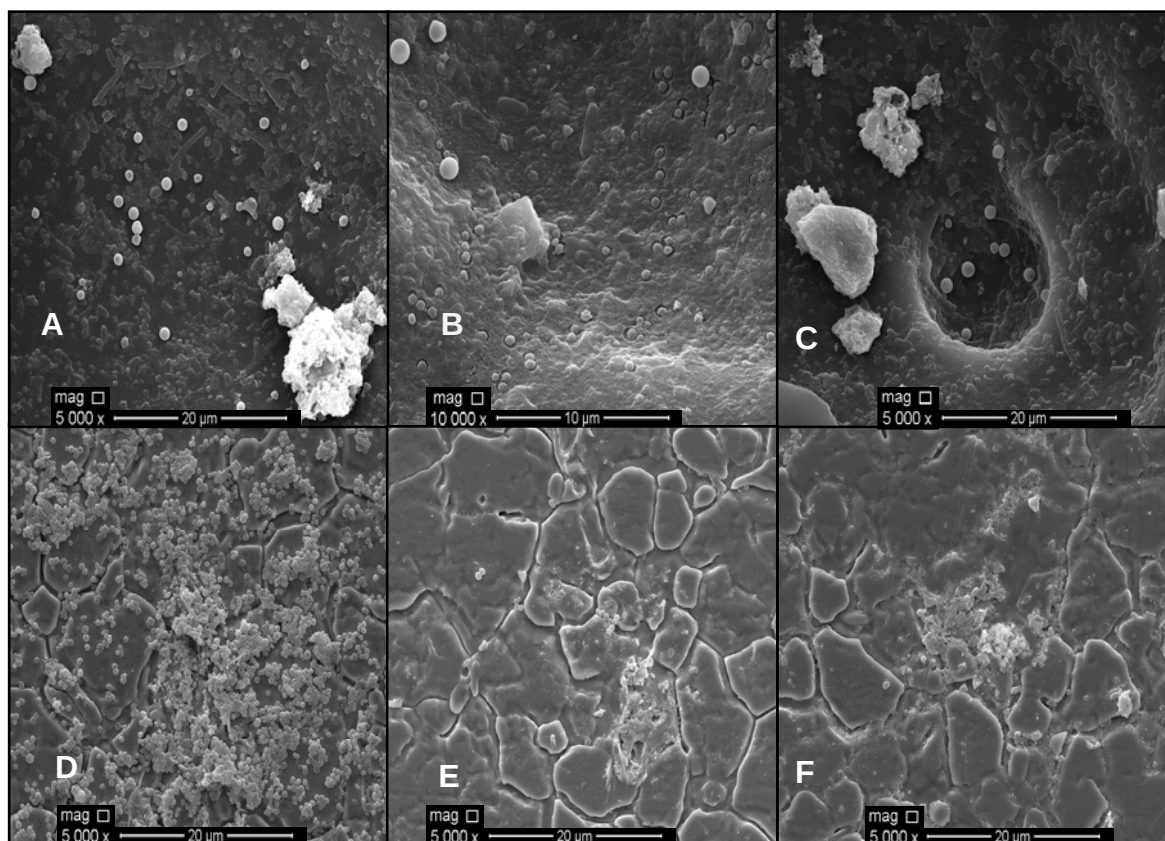


FIGURE 4.

ELECTRONIC MICROPHOTOGRAPHY OF *S. aureus* S3 CELLS ADHERED ON POLYPROPYLENE (A, B, C) AND STAINLESS STEEL (D, E, F) WHEN INCUBATED IN VEGETABLE-BASED BROTH AT 28 °C FOR 15 DAYS, AFTER THE APPLICATION OF WATER (A, D - CONTROL), PERACETIC ACID - 30 mg/L (B, E) AND SODIUM HYPOCHLORITE – 250 mg/L (C, F).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle higiênico-sanitário ao longo da processamento e distribuição de alimentos é reconhecido como condição essencial para o alcance da produção de alimentos seguros do ponto de vista microbiológico. Sabendo-se que as superfícies de contato com alimentos estão, de certa forma, susceptíveis à contaminação por diversos micro-organismos torna-se necessário a adoção de programas de sanitização dessas superfícies que sejam suficientemente eficazes para a remoção de micro-organismos diversos, evitando, assim, a ocorrência de contaminações cruzadas.

No presente estudo, *S. aureus* isolado de serviços de alimentação demonstrou, inoculado em diferentes condições experimentais, capacidade destacável de adesão, de liberação de células aderidas e de formação de biofilme. Ademais, foi verificado que a aplicação do sanitizante ácido peracético foi mais eficiente na remoção de células do biofilme do que o sanitizante hipoclorito de sódio, entretanto, ambos sanitizantes testados não apresentam eficácia nesta remoção, tendo em vista o número considerável de células remanescentes após desinfecção.

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo demonstram claras implicações para a concepção de estratégias de controle do envolvimento de biofilmes na contaminação cruzada em serviços de alimentação e nutrição, tendo em vista que as cepas utilizadas como organismos-teste foram isoladas diretamente de superfícies de contato com alimentos e os ensaios de adesão e formação de biofilme foram realizados utilizando materiais (superfícies) e temperaturas comumente encontradas em ambientes de processamento de alimentos, bem como em meio a um substrato baseado em alimentos.

Estes resultados incentivam novas pesquisas com foco na capacidade dessas cepas em aderir, separar e formar biofilmes em fluxo contínuo em superfícies utilizadas na fabricação de equipamentos e utensílios encontrados em serviços de alimentação bem como sobre a eficácia de diferentes procedimentos de higienização incluindo sanitizantes clássicos e alternativos para diminuir as células na matriz do biofilme.