

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO
INOXIDÁVEL POR *Aeromonas hydrophila* E
Staphylococcus aureus SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

CLEUBE ANDRADE BOARI

2008

CLEUBE ANDRADE BOARI

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL POR
Aeromonas hydrophila E *Staphylococcus aureus* SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Boari, Cleube Andrade.

Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e
Staphylococcus aureus sob diferentes condições de cultivo / Cleube
Andrade Boari. – Lavras : UFLA, 2008.

80 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. *Aeromonas hydrophila*. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Biofilme. 4.
Aço inoxidável. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

CLEUBE ANDRADE BOARI

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL POR
Aeromonas hydrophila E *Staphylococcus aureus* SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 6 de março de 2008.

Prof. Dr. Luiz Ronaldo Abreu	UFLA
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Prof. Dr. Luis Roberto Batista	UFLA
Profa. Dra. Rosane Freitas Schawn	UFLA
Prof. Dr. Alexandre Tourino Mendonça	UNINCOR

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A meus amados pais, Cleube e Mariana, exemplos de amor, desprendimento, alegria no coração e perseverança.

A minha irmã, sobrinho Hércules, Ale, queridos parentes e amigos.

OFEREÇO

A Deus, ao mestre Jesus e aos irmãos de Luz,
pela vida e pela constante presença a nosso lado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A meu pai, Cleube e a minha mãe, Mariana, pelo investimento, amor, paciência, confiança e apoio incondicionais.

A minha irmã Nynon, meu cunhado Ale e querido sobrinho Hércules, pelo incentivo, carinho e amizade.

Aos meus familiares, pelo carinho, em especial à Tia Hélia, Lélia e a inesquecível Tia Clélia (*in memoriam*).

A minha orientadora, amiga e conselheira Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, para quem não tenho palavras para agradecer por tudo que fez por mim.

Ao professor Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, pelo constante apoio, amizade e valorosas colaborações para o meu crescimento.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Prof. Dr. Fabiano Ribeiro do Vale, ex-Reitor, grande amigo e exemplo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela cooperação e ensinamentos, em especial à Profa. Dra. Fabiana Queiroz e à Profa. Dra. Rosemary Gualberto, pelos importantíssimos votos de confiança em meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Simone, Carol Valeriano, Victor, Thales, Danilo, Gisele, Belami, Nélio, Aline, Maíra, Suzana e Vinícius, pelo apoio e amizade.

A Mariana Pereira Alves, Mari, pela amizade, paciência e grande apoio às pesquisas.

Ao 'Seu Piano' e Eliane, pela companhia inesquecível ao longo destes oito anos.

Aos grandes e queridos amigos Lucas, Cecília, Michele, Adriana Aquino, Janine, Lívia, Mirinha e Taciana, pela companhia perfeita, pela descontração, humor e apoio.

Às secretárias e amigas do DCA: Luciana, Rafaela, Talita e Ana Paula.

Aos alunos de Engenharia de Alimentos, pelo apoio, amizade e votos de confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me ajudaram a alcançar este objetivo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Biofilmes: aspectos gerais.....	4
2.2 Definições e arquitetura de um biofilme microbiano.....	6
2.3 As fases de desenvolvimento de um biofilme.....	9
2.4 Os elementos chaves no processo de adesão e formação do biofilme.....	13
2.4.1 A fase aquosa.....	14
2.4.2 O microrganismo.....	14
2.4.2.1 Pili.....	15
2.4.2.2 Flagelos.....	16
2.4.2.3 Sistema <i>quorum sensing</i>	17
2.4.3 Interação célula-substrato.....	19
2.5 <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> : importância para a cadeia de produção de alimentos.....	21
2.5.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	21
2.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Preparo e inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.2 Estrutura para o estudo da formação do biofilme.....	26
3.3 O cultivo monoespécie.....	27
3.4 O cultivo multiespécie.....	27

3.5	Quantificação de células sésseis de <i>Aeromonas hydrophila</i>	27
3.6	Quantificação de células sésseis de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.7	Investigações complementares.....	28
3.7.1	Quantificação de células planctônicas no leite.....	28
3.7.2	Tempo de geração	28
3.7.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	29
3.8	Delineamento estatístico.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	O emprego do leite desnatado esterilizado, as temperaturas utilizadas, o período de troca do leite, o intervalo de estudo de 10 dias e a opção pelo aço inoxidável AISI 304.....	32
4.2	Tempo de geração de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Aeromonas hydrophila</i> no leite desnatado à 4, 7 e 18°C.....	33
4.3	Formação de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i>	34
4.3.1	Formação de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> em monocultivo.....	35
4.3.2	Formação de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> em cultivo com <i>Aeromonas hydrophila</i>	36
4.4	Formação de biofilme por <i>Aeromonas hydrophila</i>	38
4.4.1	Formação de biofilme por <i>Aeromonas hydrophila</i> em monocultivo.....	39
4.4.2	Formação de biofilme por <i>Aeromonas hydrophila</i> em cultivo com <i>Staphylococcus aureus</i>	40
4.5	Quantificação de células planctônicas no leite.....	41
4.6	Estudo dos biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Aeromonas hydrophila</i> utilizando a microscopia eletrônica de varredura.....	43
4.7	Considerações sobre a adesão inicial do microrganismo no aço inoxidável.....	56
5	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

ANEXO.....	72
------------	----

RESUMO

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

A formação de biofilmes microbianos em superfícies empregadas na produção de alimentos, como o aço inoxidável, vem recebendo destaque em diversas pesquisas em função dos malefícios de sua ocorrência. Estas comunidades, uma vez constituídas, agem como ponto de contaminação constante, além de outros prejuízos, como corrosão. Neste contexto, *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila* se destacam por seu potencial capacidade de aderir e formar biofilmes. A relevância destas espécies microbianas diz respeito à questões de saúde pública e deterioração. Com base no exposto, a presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* e *A. hydrophila* sob diferentes condições de cultivo, utilizando-se o aço inoxidável AISI 304 como substrato, o leite desnatado como fase aquosa e três temperaturas: 4°, 7° e 18°C. Para o ensaio em monocultivo, foram inoculados, em um litro de leite, aproximadamente, 10^8 UFC/mL de BHI de cada microrganismo, em sistemas separados, propiciando, após a diluição em 1000 mL de leite, valor de 10^5 UFC/mL. A inoculação ocorreu no tempo inicial. Cada recipiente, contendo 1L de leite, o inóculo, 1 barra magnética estéril e 10 cupons de aço inoxidável AISI (10x20 mm), suspensos, com auxílio de uma estrutura metálica, foram armazenados, sob agitação de 60 rpm, por um período de 10 dias, a 4,7° e 18°C. A cada 48 horas, 2 cupons foram coletados e recipientes, barras metálicas e leite desnatado substituídos por outros esterilizados. A enumeração das células sésseis de *S. aureus* e *A. hydrophila* foi conduzida por meio do plaqueamento seletivo em ágar Baird-Parker e *m-Aeromonas selective Haavelar* adicionado de ampicilina, respectivamente. O ensaio em cultivo combinado de *S. aureus* com *A. hydrophila* utilizou o mesmo sistema descrito, com a diferença de que ambos foram inoculados em um mesmo béquer, cada um à densidade populacional de 10^5 UFC/mL. Estudos complementares sobre o tempo de geração, a enumeração de células planctônicas e a observação dos cupons por meio da microscopia

* Comitê Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (orientadora), Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA

eletrônica de varredura foram conduzidos. O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições, sendo os tratamentos arranjados em um esquema de parcela subdividida no tempo. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS. Em monocultivo, *S. aureus* formou biofilme a 18°C, já nos primeiros dois dias e, a 7°C, a partir de 4 dias. Para 4°C, foi observado um processo de adesão. A presença de *A. hydrophila* reduziu o desempenho de *S. aureus*. Nesta condição de cultivo multiespécie houve formação de biofilme a 18°C, no qual houve, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos menos células sésseis que na condição monocultivo. *A. hydrophila* formou biofilme em todas as temperaturas e tanto em monocultivo, quanto em presença de *S. aureus*. A presença de *S. aureus* reduziu a quantidade de células sésseis de *A. hydrophila* em, pelo menos, dois ciclos logarítmicos, a partir do tempo 6 dias, em comparação ao monocultivo.

ABSTRACT

BOARI, Cleube Andrade. **Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel AISI 304 in different conditions of cultivation.** 2007. 80p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The microbial biofilm formation in surfaces used in food processing, like stainless steel, has been the focus in several researches in function of the injuries of its occurrence. These communities can act as constant point of contamination and cause other losses, as surface corrosion. In this context, *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas hydrophila* are considered due these potential capacities to attach and form biofilm. The relevance of these species is associated to public health concerns and food deterioration. Based on the exposit, the aim of this research was to verify the capability of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas hydrophila* in mono and multi-specie cultivation, using stainless steel AISI 304 as substrate and skim milk as aqueous phase, in three temperatures: 4, 7 and 18°C. To monocultivation investigation were inoculated, approximately, 10⁸ CFU/mL of BHI of each microorganism in 1000 mL of milk, in separated Becker, with a final population density of 10⁵ CFU/mL. Inoculation only occurred in the initial time. Each Becker, containing 1000 mL of milk, one sterilized magnetic bar, ten 10x20 mm sterilized chips of stainless steel AISI 304 was incubated, under 60 rpm of agitation, for 10 days at 4, 7 e 18°C, respectively. At each 48 hours 2 chips were collected and milk, Becker, and magnetic bar were substituted. Enumeration of sessile cells of *S. aureus* and *A. hydrophila* was conducted by plating in Baird-Parker agar and m-*Aeromonas* selective agar, added of ampicilin, respectively. Multi specie cultivation investigations were conducted as described above, with the difference of both microorganisms had been inoculated in the same Becker. Complementary studies included the generation time, enumeration of planktonic cells and visualization of chips by scanning electron microscopy. Treatments were set in a completely randomized split-plot design, with time in plot. Data were analyzed by statistic software SAS[®] (SAS Institute, 2007). *S. aureus*, in mono-cultivation, formed biofilm at 18°C in 48 hours and at 7 in four days. At 4°C only was observed attachment in stainless steel. In multi-specie cultivation with *A. hydrophila*, the performance of *S. aureus* was inferior. In this condition *S. aureus*

* Guidance Committee: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Adviser), Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA.

only formed biofilm at 18°C, two log units less than mono-specie cultivation. *A. hydrophila* formed biofilm in all conditions. With the exception of 4°C, in all temperatures the biofilm was formed in 48 hours. To 4°C it formed in 4 days. At 18°C, the presence of *S. aureus* reduced the number of sessile cells in two log units after 6 days, when compared with mono-specie cultivation performance of *A. hydrophila*.

1 INTRODUÇÃO

No decorrer da evolução das concepções da microbiologia figurou, por algum tempo, a hipótese de que os microrganismos, contextualizados como seres inferiores, teriam os eventos importantes de seu ciclo de vida regidos pela aleatoriedade. Entretanto, com o advento de novas técnicas e protocolos investigativos, esta visão começa a se tornar muito limitada para embasar os novos fatos que vinham sendo elucidados sobre fisiologia, genética, metabolismo e ecologia dos indivíduos. Principalmente após a elucidação do sistema *quorum sensing* e da capacidade dos microrganismos de se organizarem em comunidades, sabe-se, que estes eventos que regem o ciclo de vida dos procariontes não ocorrem devido ao acaso, sendo necessários eficientes sistemas para a regulação gênica e a comunicação entre as células.

No contexto de ecologia microbiana, os biofilmes são definidos como complexos conglomerados de células, embebidos em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), arquitetados sobre os mais variados tipos de superfície, como aquelas empregadas na cadeia de produção de alimentos. Para a sua formação são necessárias diversas etapas consecutivas, que se iniciam com a adesão do microrganismo a uma superfície, em resposta a estímulos sociais ou a alguma condição do meio, como temperatura, pH, presença de componentes orgânicos e inorgânicos, com destaque para a biodisponibilidade de nutrientes.

A adesão inicial, também tratada por adesão reversível, envolve a participação de ligações fracas, como Van der Waals, ácido-base de Lewis, pontes de hidrogênio e hidrofobicidade. Seguindo este processo, inicia-se a colonização da superfície, seguida pela chamada adesão irreversível, a co-agregação de células, a maturação da estrutura e o retorno das células ao meio. Ao longo de todas as fases, as células procariontes, no intuito de sobreviver aos

desafios impostos pelos microhábitats de um biofilme, ora caracterizados pela restrição de nutrientes, espaço e oxigênio, requerem uma refinada regulação gênica.

Todos estes desafios impostos ao microrganismo têm um benefício que compensa o ônus energético – a sua proteção e sobrevivência. Acredita-se que uma célula aderida, ou séssil, por mais caro que seja o preço de viver em uma comunidade, esteja até mil vezes mais protegida de agressões que uma outra livre ou planctônica. Incluem-se entre os agentes agressores os compostos químicos e os agentes físicos normalmente empregados nos procedimentos de higiene industrial.

Quanto aos prejuízos para a cadeia produtiva, a ocorrência dos biofilmes cada vez ganha mais destaque nas discussões focadas em qualidade e segurança de alimentos. Uma vez formadas estas comunidades agem como pontos de constante introdução de microrganismos patogênicos e deterioradores, comprometendo, assim, a inocuidade e a estabilidade de alimentos processados. Além disso, representam prejuízos de ordem econômica, pois aceleram a corrosão de superfícies, como o aço inoxidável AISI 304 (*American Iron and Steel Institute*), reduzindo a sua vida útil e prejudicando o processo de troca de calor entre superfícies, agindo como uma camada isolante.

A estratégia número um de controle é a prática de adequados procedimentos de higiene industrial, com a finalidade de remover resíduos e células de microrganismos das superfícies, impedindo a iniciação de todo o processo. Uma vez formado um biofilme, a sua posterior remoção pode ser impossível. Outra estratégia seria o controle da qualidade de matérias-primas e de insumos que, porventura, entrariam em contato com as superfícies.

A cadeia de leite e derivados, dentre todas as cadeias produtivas de alimentos, destaca-se pelo grande potencial da presença de biofilmes microbianos, haja vista a microbiota numerosa e variada potencialmente

presente no leite cru, compreendendo microrganismos patogênicos e deterioradores, bem como o fato de ser ele um meio rico e passível de favorecer os processos iniciais do biofilme.

Tendo em vista a necessidade de uma maior compreensão dos eventos que norteiam a formação dessas comunidades microbianas e almejando-se o dimensionamento de estratégias de prevenção, controle e eliminação, novas pesquisas devem buscar avaliar a interação de espécies microbianas de interesse com as superfícies usadas na produção de alimentos, bem como a dinâmica de ação de agentes sanificantes na prevenção e na eliminação de biofilmes. Além das pesquisas com microrganismos padrão, como *S. aureus* e *Escherichia coli*, em condições de monocultivo, deve-se investigar outros agentes, como *A. hydrophila*, em condições de cultivo multiespécie, visto serem estes os biofilmes mais comuns para a realidade da indústria de alimentos. *A. hydrophila*, devido à sua distribuição ubíqua, pode ser introduzida na cadeia de produção de leite e derivados em todas as suas fases produtivas. Microrganismos desta espécie são potencialmente patogênicos ao ser humano e, dessa forma, são considerados emergentes e também podem ser fortes produtores de lípases e proteases, capazes de alterar a qualidade dos alimentos, como leite UAT, mesmo após seu tratamento térmico. *S. aureus*, classicamente, é isolado em leite e seus derivados e sua introdução na cadeia se dá tanto pela mastite bovina quanto por condições inadequadas de manipulação de alimentos.

Diante do exposto, esta investigação foi conduzida com o objetivo de avaliar a capacidade de formação de biofilme em aço inoxidável AISI 304 por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*, em monocultivo e cultivo combinado, utilizando-se o leite como fase aquosa e três temperaturas de incubação: 4°, 7° e 18°C.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilmes: aspectos gerais

Os biofilmes microbianos ocorrem naturalmente nos mais variados tipos de ambiente, sejam eles bióticos, como tecidos vegetais e animais, ou abióticos, como rochas, metais e polímeros diversos. Como já elucidado, a opção por sua constituição está no fato de que estes, por meio da formação de micro-hábitats, oferecem proteção aos indivíduos que dele fazem parte contra as intempéries e os estresses do meio ambiente (Costerton et al., 1999; Maddula et al., 2006; Johnson, 2007).

Entretanto, afora a sua ocorrência natural, pesquisas sobre a sua formação em superfícies utilizadas na produção de alimentos, como aço inoxidável, vêm recebendo destaque, principalmente no que se refere aos malefícios de sua presença. Estas estruturas, uma vez constituídas, agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e ou deterioradores, podendo comprometer, assim, a qualidade microbiológica de matérias-primas, insumos e alimentos processados (Kusumaningrum et al., 2003; Fuster-Valls et al., 2008). Biofilmes também representam negatividades, no que diz respeito à corrosão de equipamentos, usualmente designada pela expressão ‘corrosão microbiologicamente influenciada’ (MIC) e pela redução da capacidade da troca de calor entre superfícies (Mansfeld, 2007).

Seguindo a hipótese de que, na natureza, a constituição destas comunidades oferecia proteção aos indivíduos, o mesmo se estende a plantas de produção de alimentos. Tal observação é feita, pois o exopolissacarídeo confere proteção aos microrganismos que passam a resistir significativamente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização que aqueles em seu estado planctônico, ou seja, não aderidos a nenhuma superfície. Alguns

pesquisadores discutem que as células, em um biofilme, sejam quinhentas (Costerton et al., 1995) ou até mil vezes (Drenkard, 2003) mais resistentes, quando comparadas às células planctônicas. Um dos grandes responsáveis por conferir esta proteção seria a rede de exopolissacarídeos, que age como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação, como, por exemplo, a membrana externa em gram-negativos. Em alguns casos, o EPS é capaz de seqüestrar cátions, metais e toxinas, conferindo, também, proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação.

Devido a este agravante, conhecer as condições que propiciam a sua formação e as suas fragilidades é primordial para que estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, sejam dimensionadas para a eliminação de mais esta possibilidade de introdução de microrganismos na cadeia alimentar (Herrera et al., 2007).

Claramente, a medida mais eficaz para a prevenção de sua formação é por meio da adoção de adequados procedimentos operacionais para a higiene industrial (Chmielewski & Frank, 2003). Na cadeia de produção de alimentos, em específico, há correlação positiva entre a falha nos procedimentos de higiene e a formação desses filmes bacterianos, pois, havendo condições, as células aderidas evoluem para microcolônias e, assim, posteriormente, ao biofilme maduro (Zottola, 1994; Arcuri, 2000).

Dentre alguns trabalhos relevantes, publicados recentemente na literatura indexada, é tratada a importância da formação de biofilmes por gêneros, como: *Pseudomonas* sp. (Ryder et al., 2007), *Staphylococcus aureus* (Herrera et al., 2007); *Escherichia coli* (Stopforth et al., 2003; Lee et al., 2007), *Listeria monocytogenes* (Harvey et al., 2007) e *Salmonella* sp. (Giarouris & Nychas, 2006).

2.2 Definições e arquitetura de um biofilme microbiano

Segundo Donlan & Costerton (2002), um biofilme corresponde a uma comunidade de células sésseis aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, no qual exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. Para Surman et al. (1996) e Bos et al. (1999) biofilmes microbianos são descritos como complexas comunidades, mono ou multiespécies, ancoradas a uma superfície (substrato), sendo estas embebidas em uma matriz constituída, basicamente, por exopolissacarídeos (EPS), como o alginato, em alguns gram-negativos.

Além do EPS, um biofilme também contém variadas partículas, como proteínas, lipídeos e outros tipos de carboidratos (Parizi, 1998). Na grande maioria, estas moléculas são provenientes da fase aquosa e, dessa forma, quanto mais rica esta for, maior será a quantidade e a variedade desses componentes em um biofilme.

As células aderidas são designadas por sésseis, enquanto aquelas livres e dispersas na fase aquosa são denominadas por planctônicas.

Um biofilme pode ser monoespécie quando sua formação diz respeito a apenas um tipo de microrganismos, ou multiespécie, quando é encontrada mais que uma espécie na comunidade. Segundo O'Toole et al. (2000) os biofilmes monoespécies ocorrem mais em tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, como consequência de processos infectivos. Em se tratando de outras superfícies, como aquelas empregadas em organizações do ramo alimentício, destacada atenção deve ser dada a biofilmes multiespécies.

A diferenciação entre o que seja adesão e o que seja biofilme tem sido proposta em função da quantidade de células presentes por cm^2 . Segundo Andrade et al. (1998) é necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , enquanto, para Ronner & Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) se

considera como biofilme um número de células aderidas de 10^3 e 10^5 células por cm^2 .

Como etapas importantes para a sua formação são descritas as bioadesões iniciais, passando os microrganismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil, a formação de microlônias, a maturação do biofilme e o destacamento de células, retornando estas a seu estilo de vida planctônico.

Em todas estas fases, uma série de transformações ocorre no íntimo do microrganismo e na sua relação com os demais indivíduos e, em razão deste fato, o seu processo de formação corresponde a um interessante objeto para se estudar o desenvolvimento microbiano (O' Toole et al., 2000). São percebidas muitas alterações fenotípicas, principalmente nos aparatos de motilidade, no tamanho da célula e no metabolismo, decorrentes da restrição de nutrientes e de oxigênio em algumas fases, da variação na taxa de reprodução e em toda a regulação gênica (Stoodley et al., 2002; Latasa et al., 2006).

Segundo Jonhson (2007), todas estas adaptações, determinadas por condições físicas, bioquímicas e genéticas são uma interessante estratégia de sobrevivência. Ainda neste contexto, em suas pesquisas, Sauer & Camper (2001) identificaram 45 diferentes proteínas produzidas por *Pseudomonas putida*, já após as seis primeiras horas de adesão, quando comparada ao mesmo microrganismo em seu estado planctônico. Tais modificações, segundo Sauer et al. (2002) seriam o produto da ativação de algo ao em torno de 30 a 40 genes. Para Beloin & Chigo (2005) estas modificações ocorrem, muito provavelmente, em consequência das orientações sociais, via sistema *quorum sensing*.

Sobre a sua arquitetura, destacam-se as seguintes características:

1) são estruturas hidratadas e viscoelásticas, cujo grau de elasticidade se relaciona à interação de exopolissacarídeos e ou proteínas com a superfície alvo (Stoodley et al., 2002). Assim como sua elasticidade, seu formato, sua espessura, seu alongamento, sua densidade e sua rigidez dependem das características

físico-químicas do ambiente e da presença ou não de fluxo. Geralmente, biofilmes formados em fluxo tendem a ser mais espessos, rígidos e alongados, como resposta ao atrito mecânico (Stoodley et al., 2002);

2) sua matriz, basicamente, se constitui por exopolissacarídeos (EPS) sincronizadamente produzidos pelos genomas microbianos, com destaque para o alginato (Cucarrela et al., 2001; Latasa et al., 2006). Além de conferir a insolubilidade em água e a conformação tridimensional do biofilme, o EPS também protege as células contra estresses de ordem física (ação mecânica, irradiações e variações de temperatura), química (agentes químicos utilizados nos procedimentos de higiene industrial) e biológica (competidores e predadores) (Cheng et al., 2007). James et al. (1995) também apontam a importância do EPS na questão de aporte de nutrientes. Nesse sentido, mesmo representando grandes ônus à célula, em função da energia demandada em sua síntese, o EPS traz indiscutíveis benefícios à sobrevivência dos microrganismos (Cucarrela et al., 2001; Latasa et al., 2006);

3) são constituídos por uma quantidade variável de microcolônias independentemente móveis e ancoradas à superfície (Stoodley et al., 2002);

4) são compostos por microcanais internos, úteis na distribuição de nutrientes e água; no escoamento de metabólitos, alguns potencialmente patogênicos ao homem; nas enzimas, como a alginatoliase e as proteases, necessárias ao destacamento de células do biofilme e na distribuição de moléculas sinalizadoras do 'quorum sensing' (Hall-Stoodley et al., 2004).

Na medida em que as técnicas para a investigação sobre a formação de biofilmes microbianos se refinam, novas elucidações vêm sendo feitas. Atualmente, é relatada, em bactérias gram-positivas, a existência de um conjunto de proteínas de superfície com, aproximadamente, 2.276 aminoácidos, associadas à adesão e à manutenção da estabilidade dos biofilmes. Além desta função, estas proteínas são importantes no processo de maturação do biofilme,

pois estas interagem com polissacarídeos especiais, denominados adesina intercelular polissacarídica (PIA), na agregação célula-célula (Planchon et al., 2006). Os primeiros grupos destas proteínas, batizadas como BAP (*biofilm associated protein*) foram encontrados em pesquisas sobre a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* (Cucarella, 2001; Latasa et al., 2006).

2.3 As fases de desenvolvimento de um biofilme

São descritos na literatura, como as etapas de um biofilme, as seguintes:

1) eventos pré-adesão: os microrganismos, em seu estilo de vida planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir em alguma superfície. Embora este processo necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influenciar já são descritos, como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores do *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, 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, 2007);

2) adesão reversível: nesta etapa ocorrem a interação célula-superfície e sua colonização inicial (Oulahal et al., 2008). O sucesso do processo de adesão depende de alguns fatores, como o aparato celular do microrganismo e as características da superfície da bactéria e do substrato. Nesta fase, a motilidade é de grande valia para o microrganismo, principalmente gram-negativos, como *A. hydrophila*. Ainda não são percebidas alterações fenotípicas, assim como na transcrição de genes, quando comparadas estas células àquelas em estilo planctônico (Sauer et al., 2002), embora os genes para a produção de exopolissacarídeos sejam ativados após 15 minutos de contato entre célula e superfície (Davies & Geesy, 1995).

Esta adesão inicial é considerada reversível, pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico (Davies et al., 1998; Sauer

et al., 2002). As principais forças que regem este evento são pontes de hidrogênio, Van der Waals, ácido-base de Lewis e hidrofobicidade (Demilly et al., 2006);

3) adesão irreversível: ocorre, aproximadamente duas horas após a adesão inicial e se caracteriza pela presença de *clusters* ou microcolônias, que correspondem a um amontoado de células aderidas entre si e a uma superfície. Admite-se que, neste momento, a motilidade cesse e genes envolvidos na comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e na produção de EPS estejam totalmente ativos, havendo, então, considerável diferença quando comparada estas células às células planctônicas (Davies et al., 1993; Donlan & Costerton, 2002). Segundo Sharma & Anand (2002) a produção significativa de EPS por microrganismos gram-negativos se inicia após cinco ou seis horas da adesão inicial. Neste momento, a principal força de ligação célula-superfície é conferida pela matriz tridimensional e insolúvel de EPS (Cheng et al., 2007);

4) maturação: corresponde à maturação da estrutura que já vem sendo formada, de maneira a lhe garantir uma maior estabilidade. Ocorre de três a seis dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias (Heydorn et al., 2000). A maturidade acontece, principalmente, 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). O aumento da população em um biofilme acontece tanto pela, embora modesta, divisão celular, quanto pela redistribuição de células entre as microcolônias e pela adesão de novas células planctônicas – co-agregação (Stoodley et al., 2002). Segundo Bos et al. (1999) os microrganismos aderidos são capazes de estimular a adesão de células planctônicas.

Neste momento, a célula se encontra bastante diferenciada quando comparada àquela em estado planctônico, principalmente no que diz respeito aos genes ativos e transcritos e ao perfil das proteínas sintetizadas. É descrita uma variação de 800 proteínas, dentre as quais se destacam as *Arc* proteínas, ligadas a processos anaeróbicos, indicando a presença de áreas com restrição de oxigênio nesta fase (Sauer et al., 2002). Ainda segundo Sauer et al. (2002), ao fim desta fase, se observa uma estrutura dinâmica, com aproximados 100 µm, contendo canais de distribuição e microcolônias e bactérias móveis;

5) destacamento de células: acontece entre 9 a 12 dias após os eventos iniciais. As células se apresentam móveis e seu perfil morfofisiológico e de transcrição genética volta a se assemelhar àquelas das células planctônicas (Sauer et al., 2002). Em pesquisas sobre o destacamento de células de *Aeromonas hydrophila*, em função da variação dos tipos e da quantidade de nutrientes, Sawyer & Hermanowicz (1998) concluíram que a taxa de destacamento se elevou proporcionalmente à depleção de nutrientes no meio, indicando que a sua limitação levaria a bactéria a buscar novas condições. Este evento ainda necessita de maiores elucidações e talvez ocorra em função de algum estresse ou pela necessidade de busca por novos nutrientes e ambientes.

Nas Figuras 1 e 2 são apresentados esquemas para as fases de um biofilme, adaptados de Jenkison & Lappin-Scott (2001) e Rickard et al. (2003), respectivamente. É interessante ressaltar que Rickard et al. (2003) propõem um modelo de formação de biofilmes multiespécie e também apresentam a importância do denominado filme condicionante, no processo como um todo. Este filme, ainda segundo estes pesquisadores, é composto por partículas e moléculas presentes na fase aquosa, como proteínas, lipídeos, polissacarídeos, mineiras e vitaminas, dentre outros. Sua presença favoreceria a adesão inicial, tendo em vista o fato de mascarar as cargas superficiais, suavizando, assim, a repulsão elétrica entre as superfícies da bactéria e do substrato. Neste contexto,

vale ressaltar a relevância dos procedimentos operacionais padronizados de higiene industrial na remoção dos resíduos que poderiam compor o filme condicionante.

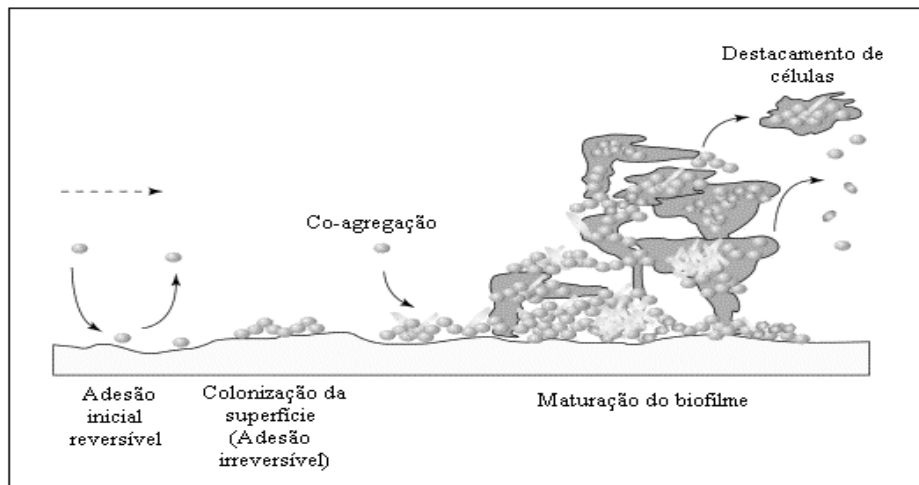


FIGURA 1 Ciclo de desenvolvimento de um biofilme (Adaptado de Jenkinson & Lappin-Scott, 2001).

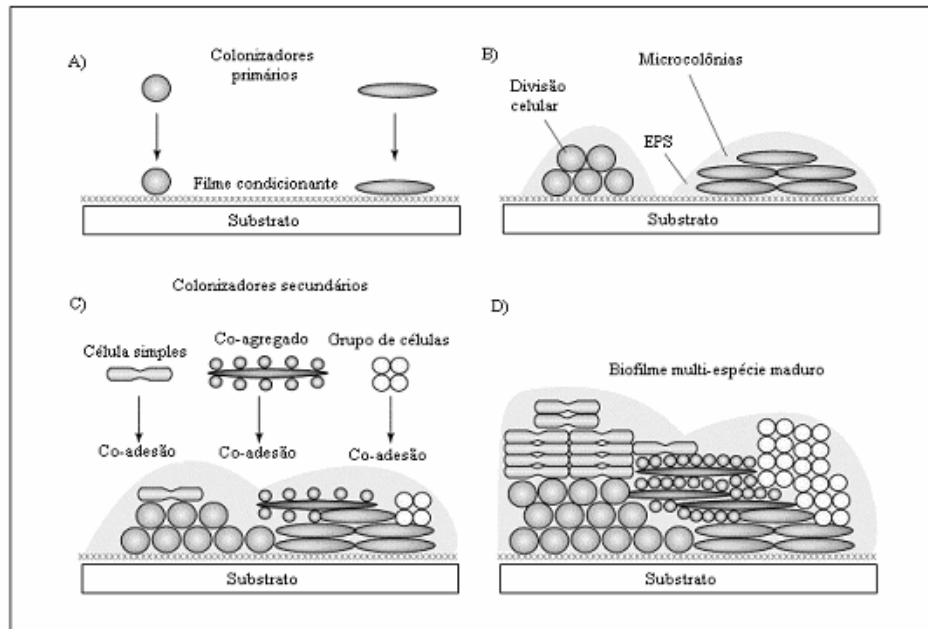


FIGURA 2 Diagrama ilustrando as etapas de formação de um biofilme multiespécie. A) Colonização primária da superfície, recoberta por um ‘filme condicionante’ composto por polissacarídeos, proteínas, lipídeos, dentre outros; B) desenvolvimento, divisão celular, síntese de EPS e composição das microcolônias; C) co-adesão de células simples e ou co-agregados de células e ou grupo de microrganismos; D) maturação e formação de mosaicos clonais em um biofilme multiespécie. (Adaptado de Rickard et al., 2003).

2.4 Os elementos chave no processo de adesão e formação do biofilme

O processo de adesão e formação de biofilme compreende três chaves principais: a fase aquosa, a célula e a interação célula-substrato (Donlan, 2002).

2.4.1 A fase aquosa

Com relação ao meio aquoso, alguns parâmetros exercem destacada influência nos processos de adesão, constituição e maturação da comunidade microbiana, como: temperatura, viscosidade, pH, presença de nutrientes, presença de moléculas orgânicas e inorgânicas, força iônica e potencial osmótico (Barnes et al., 1999; Boulange-Petermann et al., 2004; Mansfeld, 2007). Estas condições ambientais são percebidas pelos microrganismos como sinais, passíveis de estimular, ou não, a sua adesão. Além do mais, como já apresentado anteriormente, os constituintes da fase, uma vez depositados sobre o substrato, podem formar o filme condicionante.

O leite, enquanto fase aquosa, pode beneficiar o processo de adesão e de formação de biofilmes, em função de sua rica constituição em carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, bem como em função de sua alta atividade de água e pH próximo à neutralidade.

2.4.2 O microrganismo

A maior ou a menor capacidade de um isolado microbiano em aderir a uma superfície e, posteriormente, formar e manter um biofilme se relacionam estreitamente a seu genótipo e fenótipo. Uma vez presentes alguns aparatos celulares, como pili, flagelos e fímbrias, algumas proteínas de superfície, bem como sistemas de comunicação célula-célula, percebe-se um incontestável diferencial à bactéria, no que se refere à adesão e à formação de biofilme (Stoodley et al., 2002). Além desses aspectos, também são consideradas de extrema relevância as propriedades físico-químicas da superfície microbiana, com ênfase na sua carga elétrica e hidrofobicidade, visto que todo o ciclo dependerá da interação inicial entre a bactéria e o substrato. Diferentes propriedades físico-químicas da superfície bacteriana resultam em variadas

afinidades por substratos, assim como diferentes cinéticas de adesão (Van der Mei et al., 2003).

Com relação aos aparatos e às características das células, há significativa variabilidade inter e intra-espécie (Mastronicolis et al., 1998; Giovannacci et al., 2000). Afora a própria diversidade genética, a razão desta variabilidade decorre da distribuição destes organismos por diferentes habitats, o que os leva a produzir algum componente estrutural ou funcional que lhes assegure a sobrevivência. Como resposta aos desafios ambientais, os novos componentes celulares a serem estrategicamente sintetizados requerem a coordenada transcrição de genes, algumas vezes reprimidos (Oliveira et al., 2007). Justificam-se, assim, as diferenças percebidas entre uma célula planctônica e outra sésil, visto a sua exposição a diferentes habitats.

2.4.2.1 Pili

A presença de pili, como já mencionado, representa importante vantagem competitiva no processo de adesão inicial e colonização da superfície, principalmente para microrganismos gram-negativos, como a *A. hydrophila*.

O Pili tipo IV, localizado em um dos pólos da célula, é composto por moléculas de pilina, helicoidalmente organizadas, com 145 a 160 aminoácidos. O tipo de motilidade por ele conferida permite ao microrganismo se mover em superfícies semi-sólidas, como ágar e sólidas, como o aço inoxidável. Seu movimento permite a uma microcolônia a expansão radial média de, aproximadamente, 1 milímetro por hora, considerando-se as taxas médias de contração e extensão de 0,5 μ /segundo (Skerker & Berg, 2001; Mattick, 2006).

O Pili tipo IV pode se ligar a uma grande variedade de superfícies, sejam elas abióticas, como o aço inoxidável, bem como bióticas, como a superfície de outros microrganismos (adesão célula-célula) (Mattick, 2006). É interessante ressaltar que a colonização de superfícies e o deslocamento de microcolônias,

nas quais está presente o Pili tipo IV, é um movimento social, ou seja, envolve o contato célula-célula, orientando-se este por quimiotaxia (nutrientes e sinalizadores) (Mattick, 2006).

Segundo Béchet & Blondeau (2003), o Pili tipo IV, além dos benefícios da motilidade também confere à *Aeromonas caviae* a sua hidrofobicidade.

2.4.2.2 Flagelos

Os flagelos encenam destacada relevância nos processos de adesão e colonização de superfícies por microrganismos gram-negativos (Rabaan et al., 2001; Altarriba et al., 2003). Estas organelas, com fins especiais de locomoção, são constituídas por unidades de flagelina e emergem por uma extensão da membrana externa, sendo a sua força motora garantida pela diferença de potencial osmótico de sódio transmembrana e pela degradação de grupos fosfato (Gavín et al., 2002). Devido aos custos energéticos de sua manutenção, a sua expressão é altamente regulada.

Sobre os flagelos há uma interessante observação. Em meios aquosos, alguns microrganismos apresentam um flagelo polar, como já constatado por ensaios utilizando a microscopia eletrônica. Sem alguma dúvida, este elemento é de extrema importância para o processo de adesão inicial. Entretanto, após a adesão inicial, inicia-se uma diferenciada expressão gênica, sendo o flagelo polar substituído por um flagelo lateral, que confere à célula maior capacidade de se locomover por superfícies sólidas e semi-sólidas (Shimada et al., 1985; Gavín et al., 2002).

Aeromonas spp apresentam ambos os sistemas flagelares, o que eleva a sua performance de adesão, colonização de superfícies e formação de biofilmes. Em ensaios *in vitro*, Gavín et al. (2002) concluíram que mutantes de *Aeromonas* spp, ‘flagelo lateral negativo’ apresentaram redução de, aproximadamente, 85% em sua capacidade de colonização, neste caso, a células epiteliais.

2.4.2.3 Sistema *quorum sensing*

Todas as etapas do ciclo de um biofilme requerem um adequado sistema de comunicação célula-célula, denominado *quorum sensing* (QS). Seu princípio consiste na liberação de moléculas químicas sinalizadoras, por microrganismos e na sua recepção e interpretação. A sua importância fundamental consiste na distribuição, na ordenação e na sincronização das atividades dos genomas procariontes, requeridas para a manutenção da relativa homeostase da comunidade microbiana (Johnson, 2007). A elucidação deste sistema de comunicação contraria a antecessora proposta de que as células sésseis estariam aleatoriamente aderidas à superfície (Costerton et al., 1987).

Em microrganismos gram-negativos, as moléculas sinalizadoras, também designadas como autoindutores (AIs), são derivadas da *N*-acil homoserina lactona (AHL) e sua regulação se dá por meio das proteínas homólogas LuxI e LuxR. A primeira atua como uma enzima (AHL sintetase) e a segunda, ao se ligar a AHL, forma o complexo AHL-LuxR, responsável pela ativação e expressão de múltiplos genes (Ramey et al., 2004). Em bactérias gram-positivas, diferentemente de gram-negativas, a comunicação célula-célula ocorre por meio da secreção de pequenos peptídeos (Suntharalingam & Cvitkovitch, 2005).

No caso de gram-negativos, há um amplo espectro de homoserinas lactonas (Figura 3). Arevalo-Ferrero et al. (2005) identificaram algumas delas em *Pseudomonas putida*, com destaque a 3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL), 3-oxo-decanoil-homoserina lactona (3-oxo-C10-HSL), 3-oxo-octanoil-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL) e 3-oxo-hexanoil-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL).

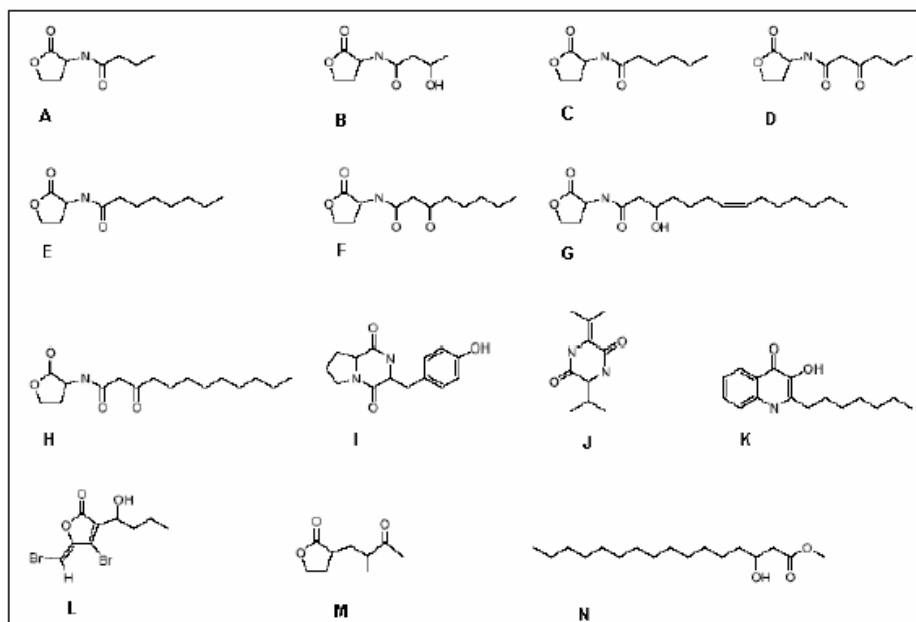


FIGURA 3 Moléculas sinalizadoras do *quorum sensing* mais comumente encontradas em microrganismos: (A) N-butanoil-L-homoserina lactona (BHL); (B) N-(3-hidroxibutanoil)-L-homoserina lactona (HBHL); (C) N-hexaóil-L-homoserina lactona (HHL); (D) N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL); (E) N-octanoil-L-homoserina lactona (OHL); (F) N-(3-oxooctanoil)-L-homoserina lactona (OOHL); (G) N-(3-hidroxi-7-*cis*-tetradecenoil)-L-homoserina lactona (HtdeDHL); (H) N-(oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL); (I,J) duas dicetopiperazinas microbianas: (I) ciclo (L-Pro-L-Tyr); (J) ciclo-(α Ala-L-Val); (K) 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS); (L) uma furanona da *Delisea pulchra*, 4-bromo-5-(brometileno)-3-(1'-hidroxibutil)-2(5H)-furanona; (M) uma butirolactona supostamente produzida por *Xanthomonas campestris*; (N) ácido 3-hidroxipalmítico metil éster (3OHPAME). Fonte: Oliveira et al. (2005).

Os microrganismos produzem constantemente estas moléculas sinalizadoras. Em baixas densidades populacionais, há, proporcionalmente,

baixas concentrações destes autoindutores e, por esta razão, talvez não haja seu impacto sobre a expressão genética. Entretanto, quando a densidade populacional de microrganismos se eleva, o mesmo acontece com a concentração dos AIs no meio, havendo, assim, influência sobre a regulação gênica (Kong et al., 2006).

Como resposta aos AIs, os microrganismos alteram a transcrição genética, variando-se, assim, a produção de exopolissacarídeos, a motilidade (supressão ou ativação de genes ligados à produção de flagelinas e pilinas), a produção de enzimas, como proteases, lípases e alginases e, também, a produção de compostos bactericidas e ou bacteriostáticos (Maddula et al., 2006). Este processo coordenativo implica na própria sobrevivência dos microrganismos nas condições desfavoráveis do biofilme, principalmente no estágio maduro, no qual há limitação na disponibilidade de oxigênio, nutrientes, componentes orgânicos e inorgânicos, como o ferro, sendo considerável, até mesmo, a restrição quanto ao espaço físico (Arevalo-Ferrero et al., 2005).

Sobre a importância do QS na organização e na distribuição de atividades entre os indivíduos de um biofilme, Sauer et al. (2002) detectaram, em seus estudos com mutantes para os genes do QS, que estes não depositam o EPS de forma a promover o desenvolvimento do biofilme, quando comparado a microrganismos selvagens, tornando-se a estrutura bastante irregular e frágil.

O sistema QS, pelo já exposto, torna-se, então, chave de ímpar relevância ao ciclo de um biofilme.

2.4.3 Interação célula-substrato

Com relação à superfície, já se sabe que nenhum dos materiais normalmente empregados na indústria de alimentos apresenta capacidade de impedir os processos iniciais de formação de um biofilme, bem como o desenvolvimento de seu ciclo (Kingshott et al., 2003).

As características do substrato são consideradas chave, pois, em função delas, o processo de adesão e a formação de um biofilme serão favorecidos ou não.

A adesão inicial corresponde ao contato entre a superfície microbiana e o substrato, regido por interações físico-químicas, que incluem pontes de hidrogênio, a hidrofobicidade, Van der Waals e as propriedades ácido-base de Lewis (Krepsky et al., 2003). Dentre estas forças, o destaque tem sido dado ao estudo da hidrofobicidade. Neste contexto, cita-se a pesquisa de Meylheuc et al. (2006) que, ao estudarem a capacidade de adesão entre isolados de *Listeria monocytogenes* em aço inoxidável, concluíram que a melhor performance foi do isolado cuja superfície apresentava maior hidrofobicidade e a pior performance foi constatada no isolado cuja superfície apresentava menor hidrofobicidade.

Os diferentes graus de hidrofobicidade de uma célula são conferidos por fatores de virulência associados à adesão, como pili, fimbrias e flagelos, bem como pela membrana externa em gram-negativos e os diferentes graus de eletronegatividade conferidos pela presença de grupos funcionais polares, como fosfatos, carboxilas, hidroxilas e ácido teicóico (Vanhaecke et al., 1990; Flach et al., 2005). Sendo o aço inoxidável uma superfície hidrofóbica, quanto maior a hidrofobicidade da célula, maior a facilidade de adesão inicial de um microrganismo (Sheng et al., 2007).

Segundo Costa (1999) as células bacterianas possuem carga negativa e de potencial de hidrogênio (pH) em torno de três. Nas gram-positivas, a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálix, e, nas gram-negativas, decorrem em função dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto aos polímeros do glicocálix.

Segundo Wirtanen et al. (1995) a topografia da superfície, embora importante, no que diz respeito à adesão inicial, parece ter uma reduzida

participação. Ainda segundo os referidos autores, micro-ranhas e microfendas seriam interessantes ao biofilme maduro, pois poderiam proteger alguma porção da comunidade contra atritos mecânicos e, em caso de danos mecânicos, a porção remanescente poderia regenerar a estrutura.

2.5 *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*: importância para a cadeia de leite e derivados

A. hydrophila e *S. aureus* compõem a extensa relação de microrganismos de importância para a cadeia de produção de alimentos, na qual se insere a de leite e seus derivados. Nos itens a seguir serão expostas as razões.

2.5.1 *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila se caracteriza como espécie gram-negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos, móvel, catalase positiva, oxidase positiva, cuja temperatura ótima de desenvolvimento é 28°C (Joseph & Carnahan, 2000; Lai et al., 2007). Este microrganismo apresenta distribuição ubíqua no ambiente, podendo estar presente nos mais diferentes tipos de matérias-primas e alimentos, como pescado e seus derivados, carnes e seus derivados, leite e seus derivados, vegetais e seus derivados, alimentos manipulados e água (Neyts et al., 2000; Suñen et al., 2003; Daskalov, 2006).

Recentes trabalhos vêm enfatizando sua emergência no cenário epidemiológico mundial, pois esta espécie vem sendo relatada como agente etiológico de uma variedade de infecções, incluindo as gastroenterites (Joseph & Carnahan, 2000; Taneja et al., 2004).

Os principais fatores de virulência produzidos por *A. hydrophila*, já elucidados, são exotoxinas, citotoxinas, endotoxinas, siderofóros, invasinas, adesinas, camada – S e flagelos (Kirov, 2003).

Microrganismos desta espécie são psicrotróficos, ou seja, mesmo apresentando como temperatura ótima para seu crescimento algo ao em torno de 28°C, são capazes de se desenvolver nas temperaturas empregadas na conservação de alimentos, com quatro e sete graus Celsius (Mano et al., 2000; Braun & Sutherland, 2005). Dessa forma, a refrigeração do leite cru, embora proporcione o controle de microrganismos mesofílicos indesejados, como *S. aureus*, acaba por favorecer o desenvolvimento de psicrotróficos, como *Aeromonas* spp. (Marchand et al., 2007).

Embora sua participação como agente etiológico de doenças veiculadas por alimentos ainda seja questionada, esta bactéria vem sendo isolada em fezes de indivíduos acometidos por infecções alimentares. Atualmente, a sua mais destacada importância é a sua capacidade de causar a deterioração de alimentos. Microrganismos desta espécie são potenciais produtores de exoenzimas termorresistentes, como lipases e proteases. Estes metabólitos, mesmo tendo a sua estrutura terciária danificada durante o processo de pasteurização, são capazes de reorganizar a sua estrutura tridimensional, tornando-se novamente ativos e passíveis de deteriorar os produtos posteriormente obtidos (Chen et al., 2003; Braun & Sutherland, 2005).

A presença de *A. hydrophila*, na cadeia de leite e seus derivados, vem sendo documentada. Bulhões & Rossi Junior (2002), ao estudarem a prevalência deste microrganismo no queijo-de-minas frescal artesanal, detectaram sua presença em 51,2% amostras (82/160), em quantidades que variaram entre $5,0 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^5$ UFC/grama. Segundo estes autores, as precárias condições de higiene no setor primário e o possível uso de água não tratada seriam pontos críticos à sua inserção na cadeia produtiva.

Freitas et al. (1993) após analisarem 35 amostras de leite pasteurizado e 25 de queijo frescal, comercializados em supermercados do Rio de Janeiro,

detectaram a presença de *A. hydrophila* em 12,8% destes produtos, respectivamente.

Carneiro & Rossi Junior (2006) em suas investigações sobre a prevalência de *Aeromonas* spp no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A, isolaram microrganismos desta espécie em 90% das amostras de leite cru (18/20), em 30% das amostras de leite da saída do pasteurizador (6/20), em 40% das amostras de leite do tanque de abastecimento do empacotador (8/20) e em 25% das amostras de leite já aptas ao consumo (5/20). *A. hydrophila* estava presente em 21,62% das amostras analisadas. Segundo estes pesquisadores, a água empregada nos procedimentos de higiene industrial, na cadeia de lácteos, caso seja de má qualidade, pode ser uma das principais fontes de introdu o de microrganismos deste g nero.

Kirov et al. (1993) ao avaliarem o potencial do leite como veículo de dissemina o de *Aeromonas* spp, detectaram a sua presença em 60% das amostras leite cru analisadas (43/72). Mesmo considerando a pasteuriza o como um procedimento eficaz na elimina o de microrganismos, os autores recuperaram em 4% (7/183) das amostras do leite submetido   pasteuriza o.

2.5.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus   um microrganismo mesofilo, entretanto, estudos comprovam que pode crescer em uma ampla margem de temperaturas (Tatini, 1973; Schmitt et al., 1990). O pH ótimo para o crescimento   de 6-7, podendo crescer entre 4 a 10. Pode desenvolver-se em meio contendo até 20% de cloreto de sódio (Tatini, 1973).   considerado como a eubacteria mais halotolerante não-halofita, crescendo até a_w (atividade de água) de 0,86 (Gutierrez et al., 1995; Wijnker et al., 2006).

S. aureus tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares, como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência, sendo

também empregadas para a sua identificação entre outras espécies de estafilococos (Madani, 1998).

O hábitat principal de *S. aureus*, em humanos e animais, é a mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal. Organismos presentes no nariz podem contaminar facilmente a pele e, assim portadores nasais podem ser portadores cutâneos (Fueyo et al., 2005). Lues & Tonder (2007) encontraram incidência de 88% das amostras ao investigarem a presença de *S. aureus* nas mãos de manipuladores de alimentos. Este fato é preocupante já que este microrganismo é reconhecido como um importante agente patogênico, por sua capacidade de produzir toxinfecções alimentares (De Buyser et al., 2001; Jorgensen et al., 2005).

Segundo Tirado & Schmidt (2001) em se tratando do cenário epidemiológico mundial, estes microrganismos são considerados a terceira mais relevante causa de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). A sua principal fonte de entrada na cadeia de leite é por meio da matéria-prima contaminada, visto que microrganismos desta espécie são um dos agentes etiológicos da mastite bovina (Cremonesi et al., 2005; Oliveira et al., 2007). Além disso, outra importante fonte de contaminação, ao longo do fluxo de produção seriam os colaboradores, haja vista a possibilidade de serem reservatórios naturais desta bactéria. André et al. (2008) em pesquisas sobre a prevalência de *S. aureus* em uma unidade de produção de leite e derivados em Goiás, Brasil, detectaram que 75% de colaboradores, de um total de 140, apresentavam este microrganismo em suas mãos.

A sua importância, no que diz respeito à formação de biofilmes, tem sido relatada em pesquisas (Herrera et al., 2007; Rode et al., 2007; Oulahal et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo e inoculação de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*

A. hydrophila ATCC (American Type Culture Collection) 7966 e *S. aureus* ATCC 25927, previamente mantidos sob congelamento em ágar simples fostatado, foram reativados em caldo triptonsoja (TSB) (Biolife, Milão, Itália), por 18 horas, em suas temperaturas ótimas de crescimento, 30° e 37°C, respectivamente. A seleção por um isolado gram-negativo e outro gram-positivo se deve ao interesse de comparar a sua prevalência de cada espécie no biofilme maduro, levando-se em consideração as suas estruturas e morfologias características peculiares.

A partir dos tubos de TSB contendo os isolados reativados foram transferidas alíquotas de um microlitro para outros tubos, também contendo caldo TSB. Cada um desses tubos, contendo *A. hydrophila* e *S. aureus*, em separado, foram novamente incubados na temperatura ótima para cada microrganismo. O crescimento de cada um dos isolados foi acompanhado até que se atingisse ao valor aproximado de 10^9 UFC/mL de caldo TSB, seguindo observações de suas respectivas curvas de crescimento.

A inoculação das bactérias foi realizada no tempo inicial do experimento. De cada tubo de TSB contendo, aproximadamente, 10^9 UFC/mL foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada no béquer contendo 1.000 mL de leite UAT, propiciando uma quantidade aproximada de 10^5 UFC/mL de leite UAT.

3.2 Estrutura para o estudo da formação do biofilme

Em um béquer estéril com capacidade para 1.000 mL foi adicionado um litro de leite desnatado esterilizado (UAT). Neste béquer, foram colocados uma barra magnética para agitação; suporte para sustentar os cupons e dez cupons de aço inoxidável AISI 304 com área de 1cm^2 por face, suspensos com o auxílio de fios de náilon (Figura 4). Cada um destes itens foi previamente esterilizado em autoclave, a 121°C , por 15 minutos, sob pressão de duas atmosferas. Cada estrutura, adequadamente lacrada com auxílio de placa de Petri e filme de PVC, foi encaminhada a uma BOD com temperatura controlada, 4° , 7° e 18°C , sob condições de agitação, a 50 rpm.

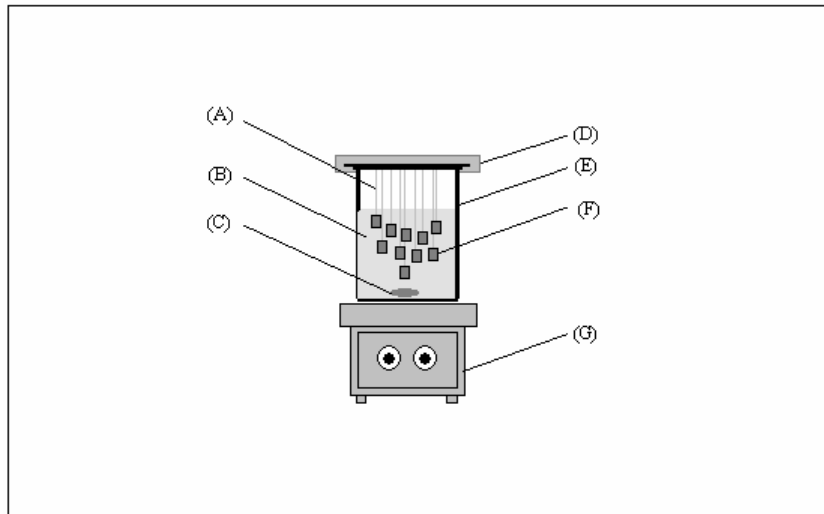


FIGURA 4 Estrutura para o estudo da formação de biofilme: (A) fio de náilon; (B) leite desnatado UAT; (C) barra magnética; (D) placa de Petri e filme PVC para lacrar o sistema; (E) béquer; (F) cupom de aço inoxidável AISI 304 com 1cm^2 de área por face; (G) agitador magnético regulado a 50 rpm.

A intervalos de 48 horas, ocorreram a coleta de dois cupons e a substituição do leite, da barra magnética e dos béqueres por outros esterilizados. O conjunto de cupons remanescentes era passado em água destilada esterilizada, pH neutro, para a retirada de excesso de leite. Aos cupons coletados, com o auxílio de *swabs* estéreis, foi aplicada a técnica do esfregão de superfície.

As temperaturas de estudo foram 4°, 7° e 18°C, por um período de 10 dias, com 5 substituições de leite e coleta de cupons (T0, T2 dias, T4 dias, T6 dias, T8 dias, T10 dias).

3.3 O cultivo monoespécie

No cultivo monoespécie, os microrganismos, tanto *S. aureus* quanto *A. hydrophila*, foram cultivados nos sistemas acima descritos, de forma individualizada.

3.4 O cultivo multiespécie

No cultivo multiespécie, *S. aureus* e *A. hydrophila* foram conjuntamente inoculados, na quantidade de 10⁹ UFC/mL de TSB de cada microrganismo, nos béqueres contendo os 1.000 mL de leite desnatado esterilizado.

3.5 Quantificação de células sésseis de *Aeromonas hydrophila*

A quantidade de células sésseis de *A. hydrophila*, presentes nos cupons, foi mensurada por meio do plaqueamento seletivo de alíquotas de 0,1 mL em ágar m-*Aeromonas* Selective Haavelar (Biolife, Milão, Itália), adicionado de ampicilina, com incubação a 28°C, por 24-48 horas.

As diluições seriadas foram conduzidas em água peptonada (0,1% p/v) (Biolife, Milão, Itália).

3.6 Quantificação de células sésseis de *Staphylococcus aureus*

A quantidade de células sésseis de *S. aureus* presentes nos cupons foi mensurada por meio do plaqueamento seletivo de alíquotas de 0,1 mL em ágar Baird-Parker (Biolife, Milão, Itália), com incubação a 37°C, por 24-48 horas.

3.7 Investigações complementares

3.7.1 Quantificação de células planctônicas no leite

No momento em que ocorriam as trocas, 1,0 mL de leite foi coletado, sendo estes submetidos a diluições seriadas, em água peptonada (0,1% p/v) e ao posterior plaqueamento seletivo em ágar Baird-Parker, com incubação a 37°C/24-48h, para *S. aureus* e ágar m-*Aeromonas selective Haavelar*, com incubação a 28°C/24-48h, para *A. hydrophila*.

3.7.2 Tempo de geração

O tempo de geração de *S. aureus* e *A. hydrophila*, nas condições experimentais, foi conduzido por meio da inoculação de 10⁴ UFC/mL de cada microrganismo, de forma individualizada, em béqueres contendo 1.000 mL de leite desnatado esterilizado. Em oito pontos, no intervalo de 4 horas e 10 horas após a inoculação (fase de crescimento exponencial), alíquotas de 1,0 mL foram retiradas do sistema, submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em ágar Baird-Parker e m-*Aeromonas selective Haavelar*, como descrito anteriormente.

Tempo de geração (G) foi calculado por meio da fórmula:

$$g = t / (3,3 \cdot \log N/N_0)$$

Sendo:

g = Tempo de geração, em minutos,

t = tempo observado, na fase de crescimento logarítmico,

N = número de microrganismos no ponto final,

N0 = número de microrganismos no ponto inicial.

3.7.3 Microscopia eletrônica de varredura

Os cupons foram preparados para microscopia de varredura utilizando-se solução fixadora (Karnovsky modificado), pH 7,2, por um período de 15 dias. Após este período, foram lavados com tampão cacodilato por três vezes de 10 minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora (mistura de volumes iguais de tetróxido de ósmio 2% - estoque - em tampão cacodilato 0,1M) à temperatura ambiente, em capela de exaustão. Após este período, lavou-se por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratou-se em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) para completar a secagem, montados em *stubs* e cobertos com ouro no metalizador (Bal-Tec SCD 050). Ao final deste procedimento, os cupons foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 Leo) (Bossola & Russell, 1998; Alves, 2004).

Todos esses procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.8 Delineamento estatístico

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com duas repetições, nas quais os tratamentos se arranjaram segundo um esquema de parcela subdividida no tempo. Os tratamentos de parcela foram dimensionados em um esquema fatorial 2x3 (dois tipos de cultivo:

mono e multiespécie, e três temperaturas: 4°C, 7°C e 18°C). Os tratamentos de parcela foram analisados ao longo de 10 dias, a cada 48 horas.

O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijkl} = \mu + b_i + t_j + bt_{ij} + \varepsilon_{ijl} + d_k + db_{ik} + dt_{jk} + dbt_{ijk} + \xi_{ijkl}$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente, na l-ésima repetição, analisada no k-ésimo dia, j-ésima temperatura e i-ésimo tipo de cultivo, com $l = 1, 2$;

μ é uma constante inerente a todas as observações;

b_i é o efeito do i-ésimo tipo de cultivo, com $i = 1, 2$;

t_j é o efeito da j-ésima temperatura, com $j = 1, 2, 3$;

bt_{ij} é o efeito da interação entre o i-ésimo tipo de cultivo com a j-ésima temperatura;

ε_{ijl} é o erro experimental associado aos tratamentos de parcela, considerado independente e identicamente distribuído, com distribuição normal de média zero e variância σ_ε^2 ;

d_k é o efeito do k-ésimo dia de análise, com $k = 1, \dots, 5$;

db_{ik} é o efeito da interação do k-ésimo dia de análise com o i-ésimo tipo de cultivo;

dt_{jk} é o efeito da interação do k-ésimo dia de análise com a j-ésima temperatura;

dbt_{ijk} é o efeito da interação do k-ésimo dia de análise com o i-ésimo tipo de cultivo e a j-ésima temperatura;

ξ_{ijkl} é o erro experimental associado aos tratamentos de subparcela, considerado independente e identicamente distribuído, com distribuição normal de média zero e variância σ_{ξ}^2 .

Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SAS (1995), sendo realizados o teste de Tukey, a 5% de significância e a análise de regressão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 O emprego do leite desnatado esterilizado (UAT), as temperaturas utilizadas, o período de troca do leite, o intervalo de estudos de 10 dias e a opção pelo aço inoxidável AISI 304

Adotou-se como padrão a utilização do leite esterilizado, pois, embora o ideal fosse utilizar o leite *in natura*, para que as diferenças entre o ensaio *in vitro* e o cotidiano fossem as menores possíveis, este apresenta uma variada microbiota que poderia interferir na avaliação dos microrganismos selecionados.

O uso do leite desnatado se deve ao fato de que os lipídeos, presentes no leite integral, poderiam favorecer a adesão e a formação de biofilmes, superestimando-se, assim, a real capacidade do microrganismo.

A temperatura de 4°C foi estudada por ser, segundo a legislação vigente para a qualidade do leite a granel, o limite superior aceito para a refrigeração do leite em tanques por expansão (Brasil, 1996). A temperatura de 7°C foi selecionada, pois esta é admitida como a temperatura máxima na qual o leite proveniente de tanques de expansão deve chegar à plataforma (Brasil, 1996).

A temperatura de 18°C foi selecionada, pois este valor pode ser alcançado em função da incorporação de leite recém-ordenhado ao tanque de expansão e sua mistura com leite previamente armazenado e, porventura, já resfriado.

O período para substituição do leite nos béqueres, a cada 48 horas, foi dimensionando em acordo com a legislação vigente para a qualidade do leite cru (Brasil, 1996), que estabelece este como sendo o tempo máximo entre a ordenha e o recebimento do leite cru no estabelecimento onde será processado.

O aço inoxidável AISI 304 foi selecionado como substrato à adesão e à formação de biofilme, visto ser esta a superfície mais empregada em plantas de produção de alimentos (Hood & Zottola, 1997).

4.2 Tempo de geração de *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila* no leite desnatado a 4, 7 e 18°C

Os tempos de geração, em minutos, para o crescimento de *S. aureus* e *A. hydrophila*, em leite desnatado UAT, são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 Tempo de geração, em minutos, para *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*, a 4°, 7° e 18°C

	Tempo de geração (g)		
	4°C	7°C	18°C
<i>Aeromonas hydrophila</i>	50	47	41
<i>Staphylococcus aureus</i>	61	58	50

Não foi investigado o tempo de geração de *S. aureus* e *A. hydrophila* em conjunto, pois, seguindo informações de pré-experimento, não houve diferença significativa entre este e o cultivo monoespécie, para as temperaturas e o intervalo de tempo estudado.

Tanto para *S. aureus* quanto para *A. hydrophila*, foi percebida uma elevação no tempo de geração, na medida em que houve o abaixamento da temperatura. O significado prático disso é o de que o tempo necessário para que ocorra a duplicação da população será maior, quanto maior for g.

A temperatura é considerada um dos mais importantes fatores extrínsecos capazes de influenciar o desenvolvimento bacteriano. Neste contexto, a elevação no tempo de geração, percebida tanto de *S. aureus* quanto *A. hydrophila*, em resposta ao abaixamento da temperatura se explica, principalmente, em função da redução da cinética de reação das enzimas.

Quanto mais afastados de seu ótimo, menor a taxa metabólica e, conseqüentemente, menor a taxa de reprodução.

Observa-se que, no leite desnatado esterilizado e nas temperaturas avaliadas, o maior tempo de geração de *A. hydrophila* (50 minutos em 4°) coincide com o menor resultado para *S. aureus* (50 minutos em 18°C).

A. hydrophila, em todas as temperaturas estudadas, exibiu um desempenho 18% superior ao *S. aureus*.

A melhor performance de *A. hydrophila*, analisando-se apenas o seu tempo de geração, poderia ser um dos fatores a favorecer os processos de adesão e de formação de biofilmes, em detrimento de *S. aureus*, como será visto mais adiante.

Não foram encontrados dados, na literatura indexada, que permitissem a confrontação destes resultados.

4.3 Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*

Na Figura 5 são apresentadas as curvas da quantidade de células sésseis de *S. aureus*, expressas em log UFC/cm², para os tempos e as temperaturas estudadas, tanto em monocultivo, quanto em presença de *A. hydrophila*.

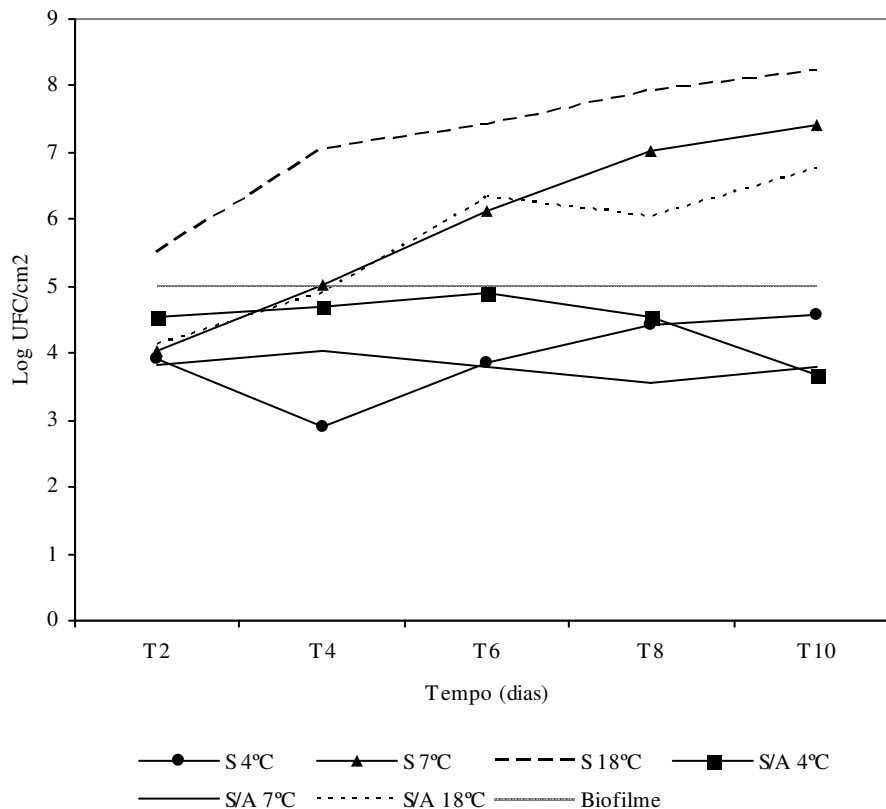


FIGURA 5 Contagem de células sésseis de *S. aureus* presentes em cupons de aço inoxidável AISI 304, ao longo de 10 dias, para as temperaturas de 4°, 7° e 18°C, nas condições de monocultivo e na presença de *A. hydrophila*

4.3.1 Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* em monocultivo

Com relação à formação de biofilme monoespécie *S. aureus* e considerando-se o valor 10^5 UFC/cm² ou 5 Log UFC/cm² para delimitar o que seria um biofilme ou um processo de adesão, percebe-se que, nas primeiras 48 horas, apenas foi constatada a formação de biofilme a 18°C. A 7°C, houve a formação de biofilme após 4 dias. Para ambas as temperaturas foi observada

tendência linear de aumento de células sésseis ao longo dos 10 dias pesquisados, chegando estas a valores de $1,7 \times 10^8$ UFC/cm² e $2,5 \times 10^7$ UFC/cm², respectivamente. De acordo com Heydarn et al. (2000) e Stoodley et al. (2002) o aumento de células em um biofilme faz parte de seu próprio processo de maturação, podendo compreender até 10 dias após a adesão inicial. Segundo estes autores, este aumento ocorre em decorrência da divisão celular e da co-adesão de outras células presentes no sistema em seu estado planctônico.

Não foi observada a formação de biofilme a 4°C, caracterizando-se, então, um processo de adesão microbiana. Para esta situação, o número máximo de células observadas por centímetro quadrado, no décimo dia, foi de $3,7 \times 10^4$ UFC/cm².

Com exceção do tempo 2 dias, no qual não houve diferença significativa (P<0,05) entre as três temperaturas estudadas, para os demais tempos foi percebida menor performance do microrganismo a 4°C. Não foi percebida diferença significativa entre o desempenho do microrganismo a 7 ou a 18°C (P<0,05).

4.3.2 Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* em cultivo com *Aeromonas hydrophila*

Em se tratando do cultivo multiespécie, combinando-se *S. aureus* e *A. hydrophila*, foi observada a formação de biofilme apenas a 18°C, a partir do quarto dia. O número de células planctônicas, neste caso, foi de $5,7 \times 10^6$ UFC/cm², ou seja, aproximadamente dois ciclos logarítmicos inferior ao biofilme monoespécie.

Para a temperatura de 7°C, na qual foi observada a formação de biofilme por *S. aureus*, em monocultivo, não foi observado o mesmo comportamento quando em cultivo com *A. hydrophila*.

Analisando-se o tempo de geração, percebe-se que *A. hydrophila* apresenta desempenho reprodutivo superior ao *S. aureus*, podendo, assim, delimitar a sua adesão por competição.

A 4°C, repetindo o resultado do cultivo monoespécie, apenas foi observada a adesão de *S. aureus*, não havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre a performance de *S. aureus* monoespécie ou em presença de *A. hydrophila*. Em T6 foi observada uma quantidade de células aderidas de *S. aureus* suficiente para classificar sua presença como biofilme ($1,2 \times 10^5$ UFC/cm²) que, no entanto, se reduziu a $3,5 \times 10^4$, em T8 e a $4,7 \times 10^3$ UFC/cm², em T10.

De acordo com Oulahal et al. (2008), *S. aureus*, embora seja um microrganismo mesofílico, ou seja, com temperatura ótima para seu desenvolvimento em torno de 37°C, é capaz de sobreviver em temperaturas empregadas na refrigeração de alimentos, sem, no entanto, apresentar bom crescimento. A informação destes pesquisadores coincide com o encontrado nesta pesquisa.

Aos 18°C, em presença de *A. hydrophila*, *S. aureus* formou biofilme no T6, com, aproximadamente, $2,2 \times 10^6$ UFC/cm². Na condição de monocultivo, *S. aureus*, nesta temperatura, já havia formado biofilme no T2. Neste tempo, embora não se tenha detectado diferença significativa entre o desempenho de *S. aureus* em monocultivo e em presença de *A. hydrophila*, percebe-se que, levando-se em consideração o número de células que caracterizam o biofilme houve diferença entre a primeira condição, com $3,2 \times 10^5$ UFC/cm² células de *S. aureus* e, em presença de *A. hydrophila*, com $1,3 \times 10^4$ UFC/cm². Para os demais tempos, não foi detectada diferença significativa entre a performance de *S. aureus* e *S. aureus* com *A. hydrophila*.

Para 18°C, em cultivo do *S. aureus* em presença de *A. hydrophila*, percebe-se, novamente, a tendência linear de aumento de células ao longo do tempo pesquisado.

O maior número de células sésseis de *S. aureus*, em monocultivo, foi encontrado nas condições 18°C/T10, sendo este de $1,7 \times 10^8$ UFC/cm², e o maior número em cultivo com *A. hydrophila* em 18°C/T10 de $5,7 \times 10^5$, sendo quase três ciclos logarítmicos inferior.

Pompermayer & Gaylarde (2000) em sua pesquisa sobre a adesão de *S. aureus* e *Escherichia coli*, em condição de monocultivo e em *mix* destes dois microrganismos, concluíram que o melhor desempenho de *S. aureus* aconteceu em culturas homogêneas. Segundo estes mesmos pesquisadores, há uma superioridade de microrganismos gram-negativos em se aderir e formar biofilmes devido aos aparatos celulares por eles apresentados, bem como o seu menor tempo de geração, o que garante a sua dominância, em relação a gram-positivos. Tais informações também estão de acordo com Banks & Bryers (1991), que tratam de que a dominância e a prevalência de um microrganismo em um biofilme em muito se relaciona com sua taxa de crescimento e reprodução.

4.4 Formação de biofilme por *Aeromonas hydrophila*

Na Figura 6 são apresentadas as curvas da quantidade de células sésseis de *A. hydrophila*, expressas em log UFC/cm², para os tempos e temperaturas estudadas, tanto em monocultivo quanto em presença de *S. aureus*.

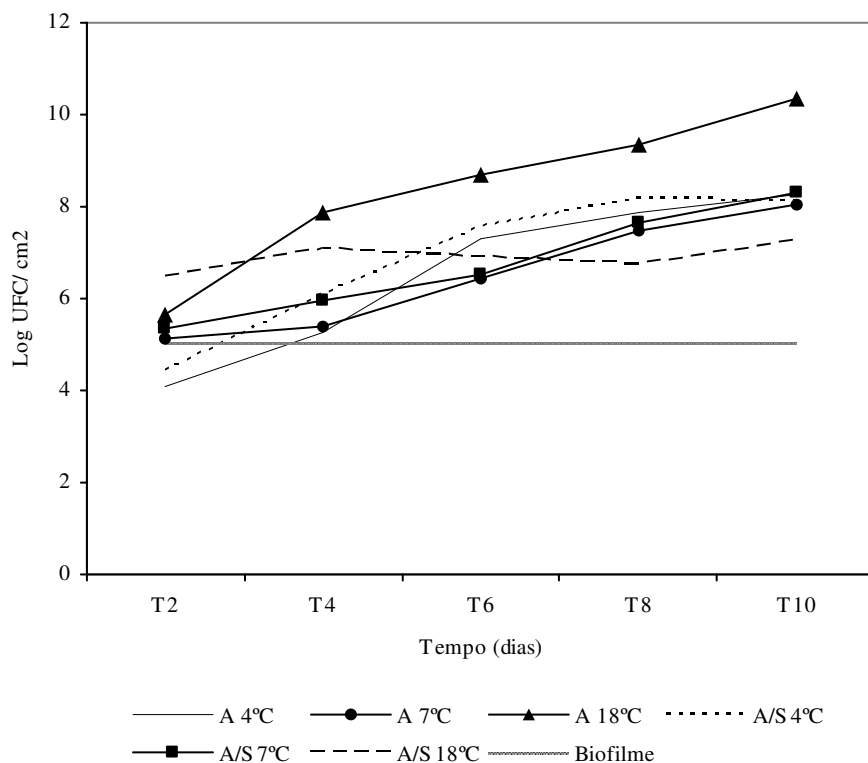


FIGURA 6 Contagem de células sésseis de *A. hydrophila* presentes em cupons de aço inoxidável AISI 304, ao longo de 10 dias, para as temperaturas de 4°, 7° e 18°C, nas condições de monocultivo e na presença de *S. aureus*

4.4.1 Formação de biofilme por *Aeromonas hydrophila* em monocultivo

A. hydrophila formou biofilme em todas as temperaturas analisadas, sendo que, para 7° e 18°C já haviam o formado no segundo dia, com contagens de $1,4 \times 10^5$ e $4,7 \times 10^5$ UFC/cm², respectivamente. Para 4°C, foi observado biofilme a partir de t4, com $1,7 \times 10^5$ UFC/cm².

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre 4° e 7°C, ao longo dos tempos estudados. O melhor desempenho foi observado a 18°C, no qual, em T10 foram quantificadas $2,2 \times 10^{10}$ UFC/cm².

Para todas as temperaturas, foi observada uma tendência linear de aumento de células sésseis no biofilme.

4.4.2 Formação de biofilme por *Aeromonas hydrophila* em cultivo com *Staphylococcus aureus*

Para 4° e 7°C, não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o desempenho de *A. hydrophila* em monocultivo ou em presença de *S. aureus*. Em tais condições, também foi observada tendência linear no aumento de células planctônicas. Entretanto, para 18 graus, a partir do sexto dia, foi observada uma redução na quantidade de células de *A. hydrophila* aderidas, em função da presença de *S. aureus*. Tal fato pode ter ocorrido, pois *S. aureus*, na medida em que se aproxima de sua temperatura ótima tem sua taxa metabólica aumentada, colaborando de forma mais representativa no consumo de nutrientes do meio, o que prejudicaria o desempenho da *A. hydrophila*. Segundo Sawyer & Hermanowicz (1998) a depleção de nutrientes é um dos fatores que desestimulam a formação de biofilme por *A. hydrophila* e, além disso, é interpretada como sinal positivo ao destacamento de células.

Tanto na condição monoespécie, quanto multiespécie, em combinação com *S. aureus*, *A. hydrophila* formou biofilme em todas as condições investigadas. Seu melhor desempenho foi observado no biofilme monoespécie a 18°, no qual foi observada quantidade de células planctônicas de $9,5 \times 10^{10}$ UFC/cm². Apenas para as condições *A. hydrophila* 4°C e *A. hydrophila* com *S. aureus* 4°C não foi observada a formação de biofilme nas primeiras 48 horas. Para as demais, o valor de 10^5 UFC/cm² já havia sido ultrapassado neste tempo.

A combinação de *S. aureus* e *A. hydrophila* reduziu a performance deste segundo microrganismo, comparando-se à quantidade de células no estado sésseis aos 10 dias. A redução foi de três ciclos logarítmicos, com valor de $1,7 \times 10^7$ UFC/cm².

Na Tabela 2 são apresentadas as contagens em UFC/cm² e as percentagens de cada um dos microrganismos, no biofilme multiespécie, no tempo 10 dias, para cada uma das temperaturas avaliadas. Para as temperaturas de 4° e 7°C, nas quais não houve formação de biofilme por *S. aureus*, a sua participação, em total de células sésseis, foi de 0,0033%, em comparação com os 99,99% de *A. hydrophila*. Aos 18°C e em cultivo com *A. hydrophila*, *S. aureus* formou biofilme; a participação de *S. aureus* foi maior, chegando a 24,9% das células sésseis.

TABELA 2 Participação de *S. aureus* e *A. hydrophila*, em UFC/cm² e sua percentagem, em biofilme multiespécie, com 10 dias, nas temperaturas de 4°, 7° e 18°C.

		<i>S. aureus</i>	<i>A. hydrophila</i>	Total
4°C	UFC/cm ²	4,7 x 10 ⁷	1,4 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁷
	%	0,0033%	99,9967	100%
7°C	UFC/cm ²	6,3 x 10 ³	2,0 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸
	%	0,0031%	99,9969	100%
18°C	UFC/cm ²	5,8 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁷
	%	24,9%	75,1%	100%

4.5 Quantificação de células planctônicas no leite

Na Tabela 3 são apresentadas as contagens de células planctônicas no leite, ao longo do tempo e das condições estudadas. Para cada cupom foi considerada uma área de 2 cm², pois, por serem mantidos em suspensão, exibiam duas faces de contato com a fase aquosa.

TABELA 3 Valores médios para a contagem de células planctônicas no leite desnatado esterilizado, expressos em log UFC/mL, observados nas condições de monocultivo e cultivo combinado de *S. aureus* e *A. hydrophila*, ao longo do tempo e nas temperaturas de 4°, 7° e 18°C

	Tempo (dias)/ área cm ²					
	Inoc. ¹	2	4	6	8	10
	20cm ²	20cm ²	16cm ²	12cm ²	8cm ²	4 cm ²
S 4°C	5	6,51	6,4	6,32	6,54	6,0
S 7°C	5	6,44	6,55	6,72	6,19	6,9
S 18°	5	7,5	7,25	7,34	7,9	7,5
S/A 4°C	5	6,6	6,32	5,88	5,22	6,17
S/A 7° C	5	6,7	5,07	6,13	6,38	6,47
S/A 18°C	5	7,0	7,1	6,0	6,69	6,14
A 4°C	5	6,59	6,56	7,22	6,28	6,55
A 7°C	5	6,69	6,61	7,12	6,84	6,6
A 18°C	5	7,79	7,28	7,42	7,59	7,5
A/S 4°C	5	6,8	5,8	6,1	6,24	6,8
A/S 7°C	5	6,92	6,6	5,98	6,37	3,66
A/S 18°C	5	7,4	6,32	6,47	6,61	7,2
Média	5	6,9	6,48	6,56	6,57	6,46

¹ – Inoculação de microrganismos no sistema

De posse dos dados, observa-se que, 48 horas após a inoculação de 10⁵ UFC/mL, a contagem de células planctônicas de *S. aureus* e *A. hydrophila*, tanto em monocultivo quanto em cultivo combinado, estava em torno de 10⁶ ou 10⁷ UFC/mL de leite, sendo, em média, 6,9. Para os demais tempos, houve, também, uma tendência à presença de células planctônicas no intervalo de 10⁶ e 10⁷ UFC/mL. É interessante salientar que, mesmo havendo a troca do leite, dos béqueres e da barra magnética por outros esterilizados e a retirada de dois cupons (área de 4 cm² de contato), a contagem destes microrganismos no leite, a princípio zero, atingiu um patamar semelhante, independente do tipo de microrganismos, cultivo mono ou multiespécie, temperatura e tempo.

Conclui-se, sobre este aspecto, que as células sésseis de *S. aureus* e *A. hydrophila* apresentam considerável capacidade de retorno à sua fase planctônica e atingiram altas densidades populacionais (de zero a 10^6 - 10^7 UFC/mL, a cada 48 horas).

4.6 Estudo dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila* utilizando a microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 7 é apresentado, em A, B e C, o processo de adesão e de formação de biofilme por *A. hydrophila* a 18°C. Às 6 horas (A), é possível observar células aderidas ao aço inoxidável, na fase já denominada adesão irreversível. Neste momento, os genes para a síntese de exopolissacarídeos se encontram ativos e a matriz começa a ser sintetizada. Aos 2 dias (B), observa-se uma quantidade de células aderidas que já seriam suficientes para classificar o processo como um biofilme. Aos 10 dias (C), se visualiza o biofilme maduro, com uma considerável quantidade de EPS depositado. Em D, E e F, são observados os mesmos processos para o *S. aureus* em monocultivo. Nas micrografias, é possível observar a menor capacidade deste microorganismo em produzir exopolissacarídeos, quando comparado à *A. hydrophila* (micrografia D versus C). Em G, H e I, são observadas as micrografias do cultivo combinado com *S. aureus* e *A. hydrophila*. Na imagem I, aos 10 dias, a população estimada foi de $2,3 \times 10^7$ UFC/cm².

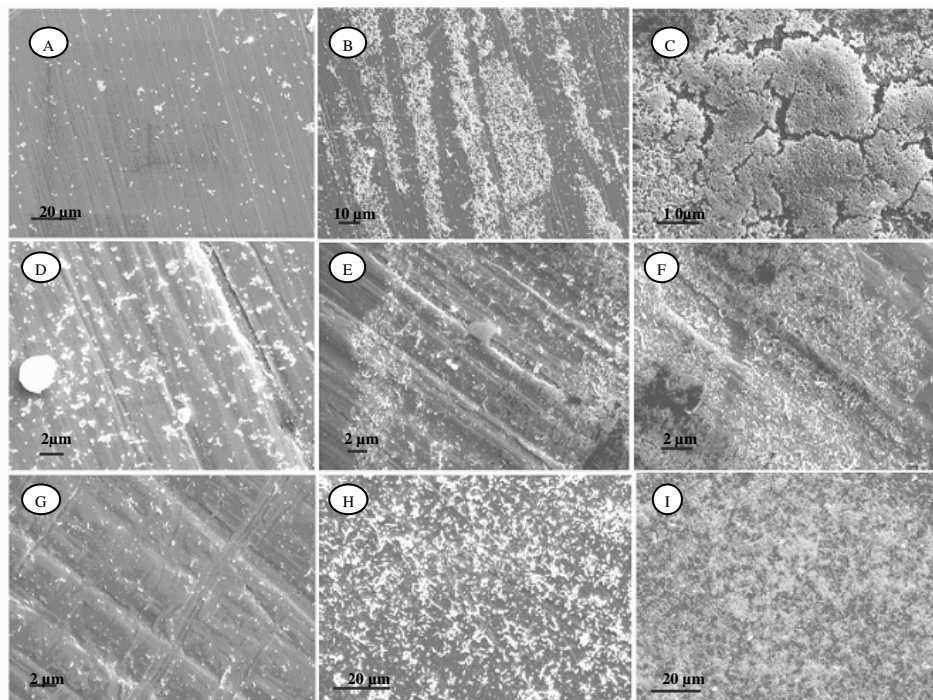


FIGURA 7 Eletromicrografia de varredura da adesão e formação de biofilmes por *S. aureus* e *A. hydrophila* em cupons de aço inoxidável AISI 304 a 18°C. A) *A. hydrophila* após 6 horas de inoculação em leite desnatado esterilizado; B) *A. hydrophila* após 2 dias de contato; C) *A. hydrophila* após 10 dias de contato; D) *S.aureus* após 6 horas de contato; E) *S. aureus* após 2 dias; F) *S. aureus* após 10 dias; G) *S.aureus* e *A. hydrophila* em cultivo combinado, após 6 horas; H) *S.aureus* e *A. hydrophila* em cultivo combinado, após 2 dias; I) *S.aureus* e *A. hydrophila* em cultivo combinado, após 10.

Na Figura 8, são apresentadas duas eletromicrografias e *A. hydrophila* em monocultivo a 4°C, no tempo de 6 horas. É interessante observar as microfendas e microrranhuras na superfície do aço (8-A), a célula de *A. hydrophila* (8-B) e o início da formação de microcolônias e produção de EPS (8-C).

Na Figura 9 observam-se as eletromicrografias de *A. hydrophila*, a 4°C, em 48 horas após a adesão inicial. Neste momento, embora bastante colonizada

a superfície, ainda não havia a quantidade de células sésseis para classificar o processo como biofilme. Na Figura 10 é possível observar o biofilme maduro de *A. hydrophila*, em monocultivo, após 10 dias de incubação a 4°C. Percebe-se a grande deposição de EPS. Um biofilme maduro de *A. hydrophila* também é apresentado na Figura 11, com incubação a 18°C. Houve forte colonização da superfície neste momento.

Nas Figuras 12, 13 e 14 são observadas eletromicrografias de *S. aureus* em monocultivo, a 4°C, nos tempos 6 horas, 2 dias e 10 dias, respectivamente. Confrontando estas eletromicrografias com aquelas obtidas de *A. hydrophila*, se observa que *S. aureus* apresenta menor capacidade de sintetizar e depositar o EPS. Nesta temperatura, não foi formado biofilme por este microrganismo. Entretanto, embora havendo um processo de adesão, a quantidade de células planctônicas no leite foi elevada.

Nas Figuras 15, 16 e 17 são observadas micrografias do processo de adesão e formação de biofilme por *S. aureus* e *A. hydrophila*, em cultivo combinado a 4°C.

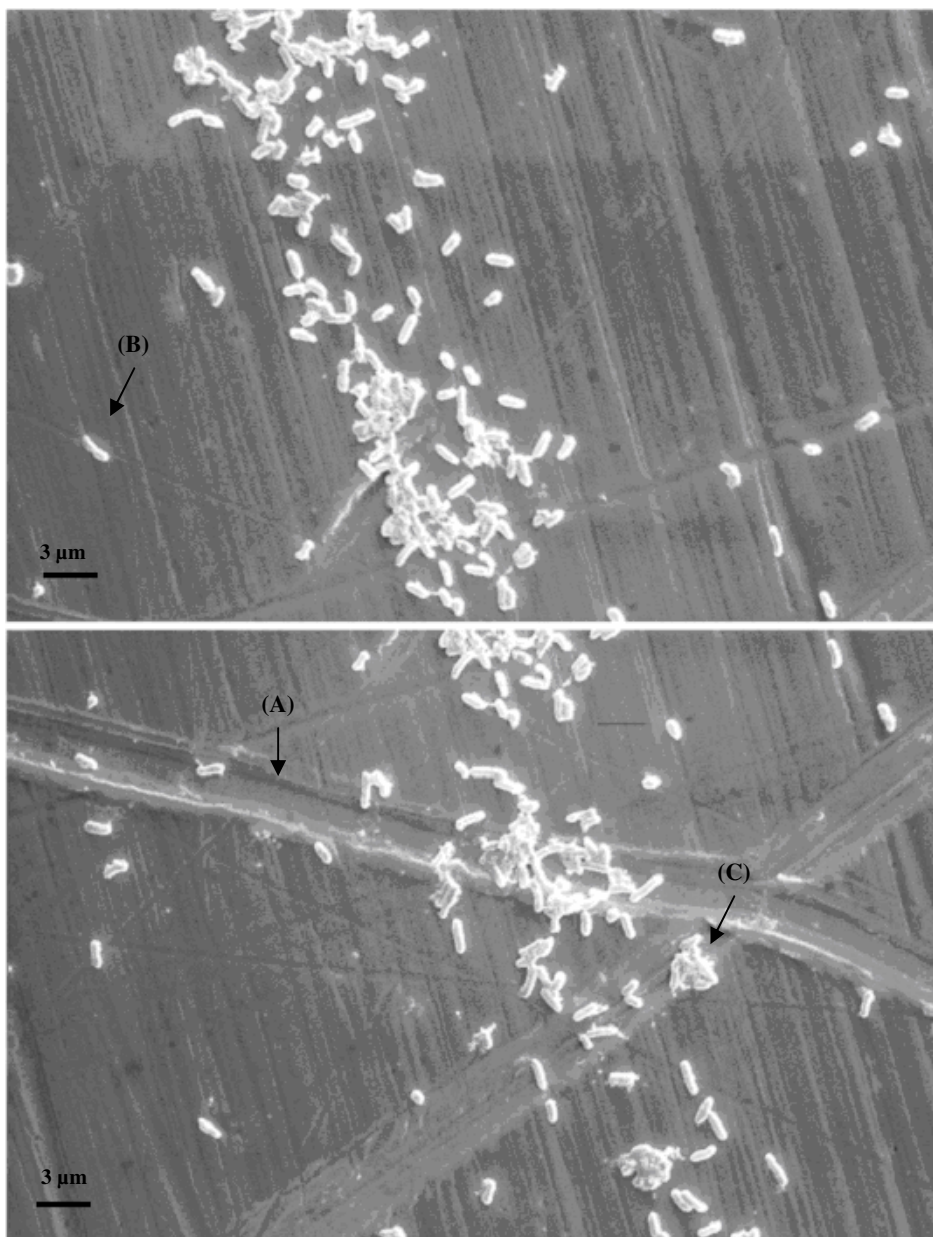


FIGURA 8 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* cultivada a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após seis horas de contato.

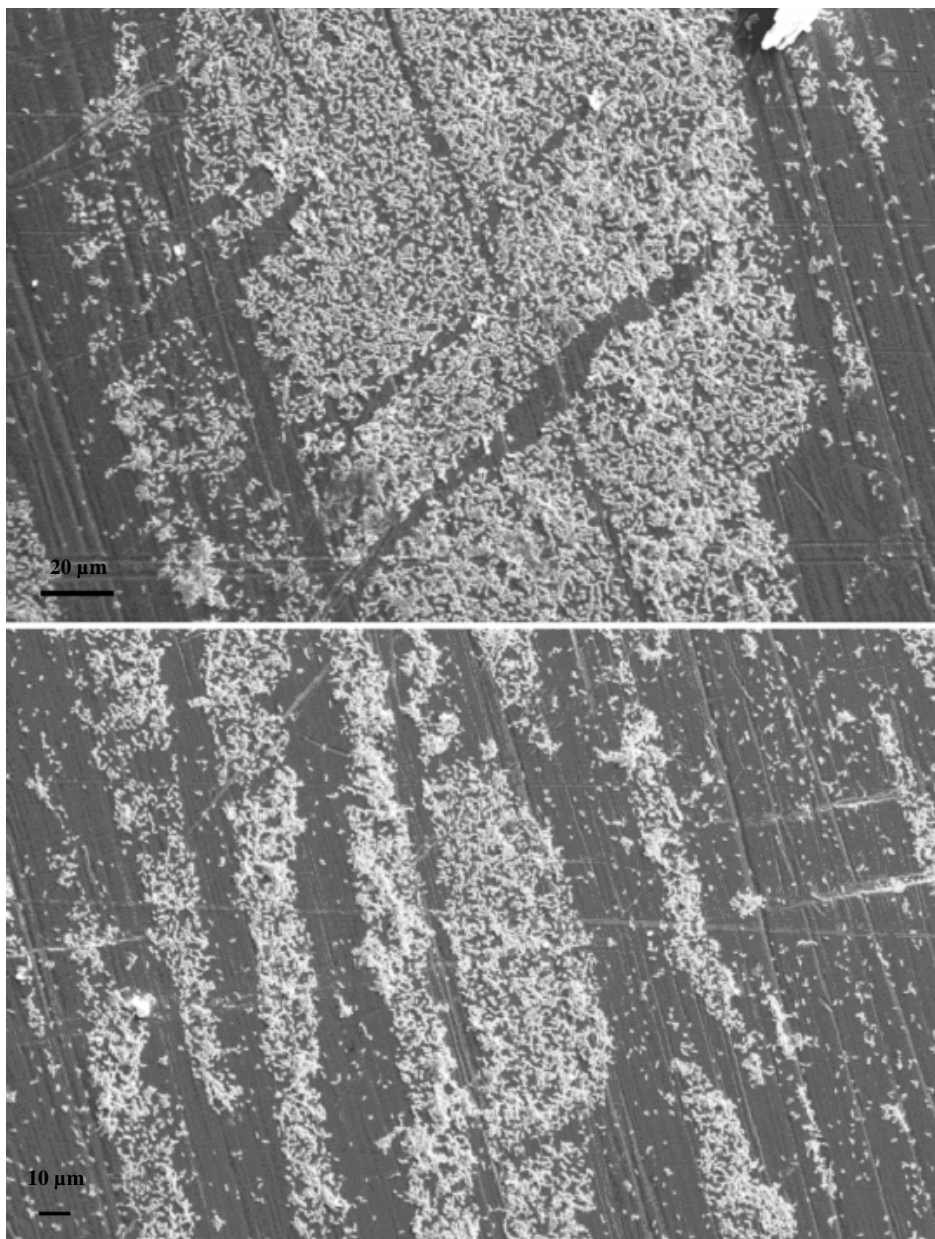


FIGURA 9 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* cultivada a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após dois dias de contato.

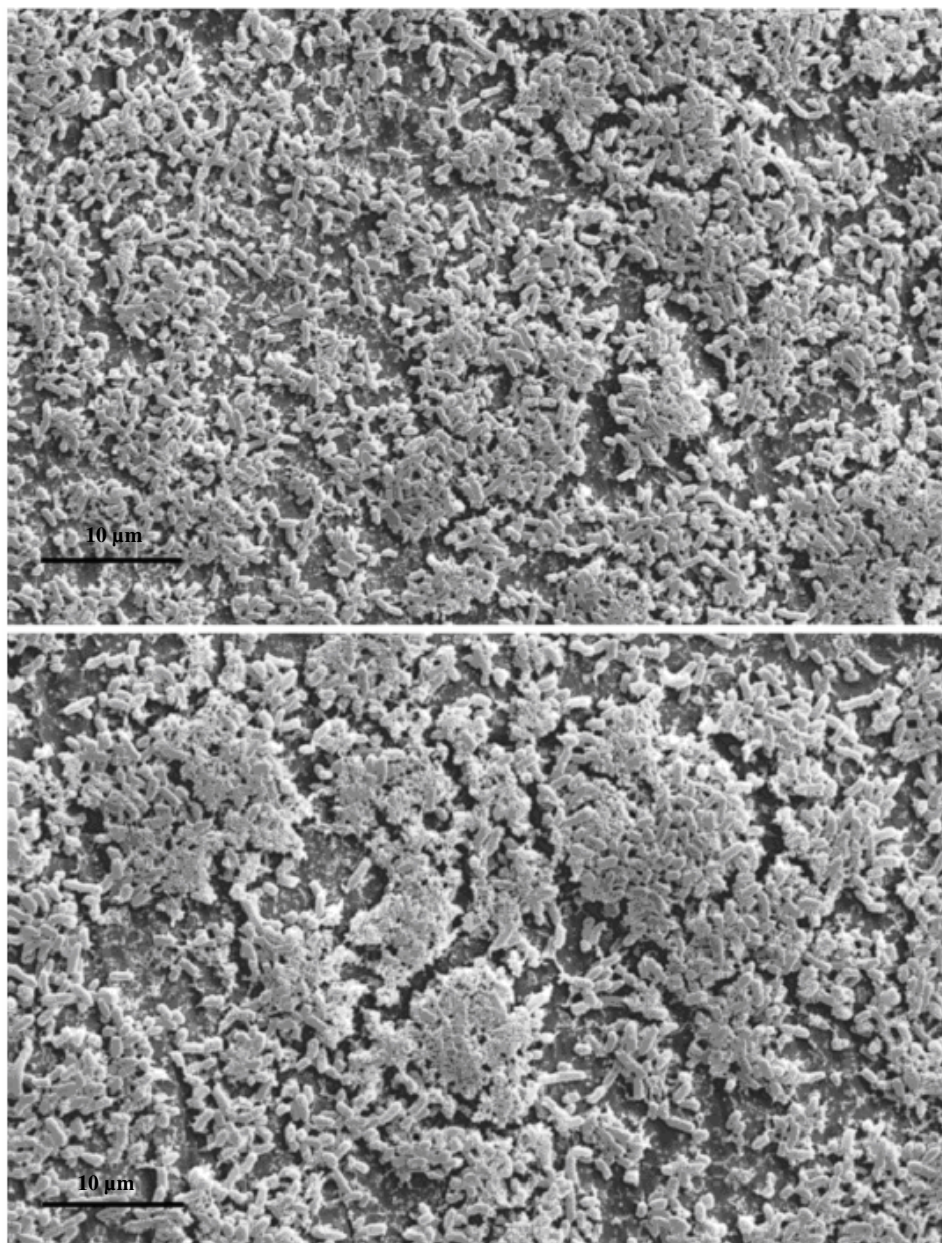


FIGURA 10 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* cultivada a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após dez dias de contato.

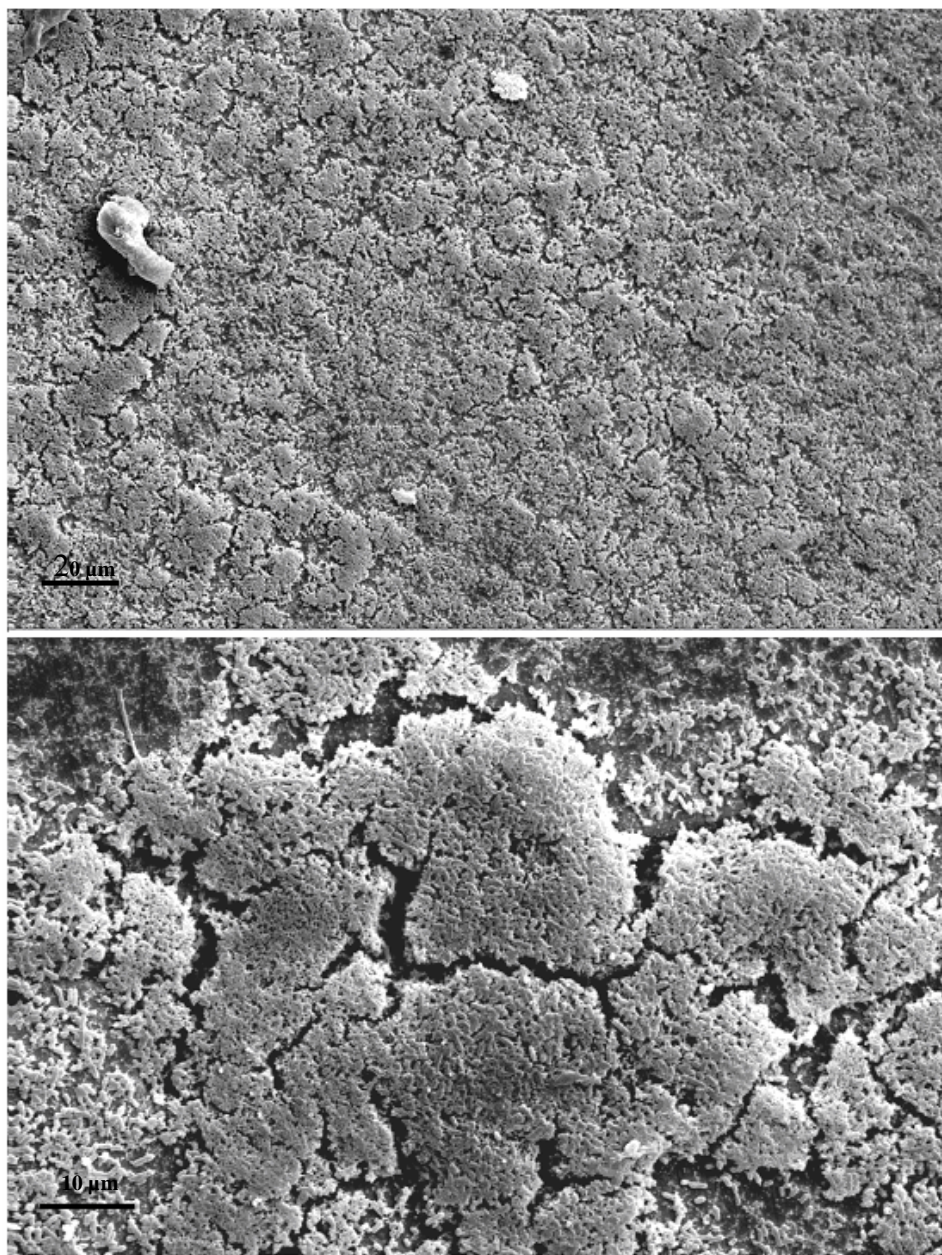


FIGURA 11 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* cultivada a 18°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após dez dias de contato

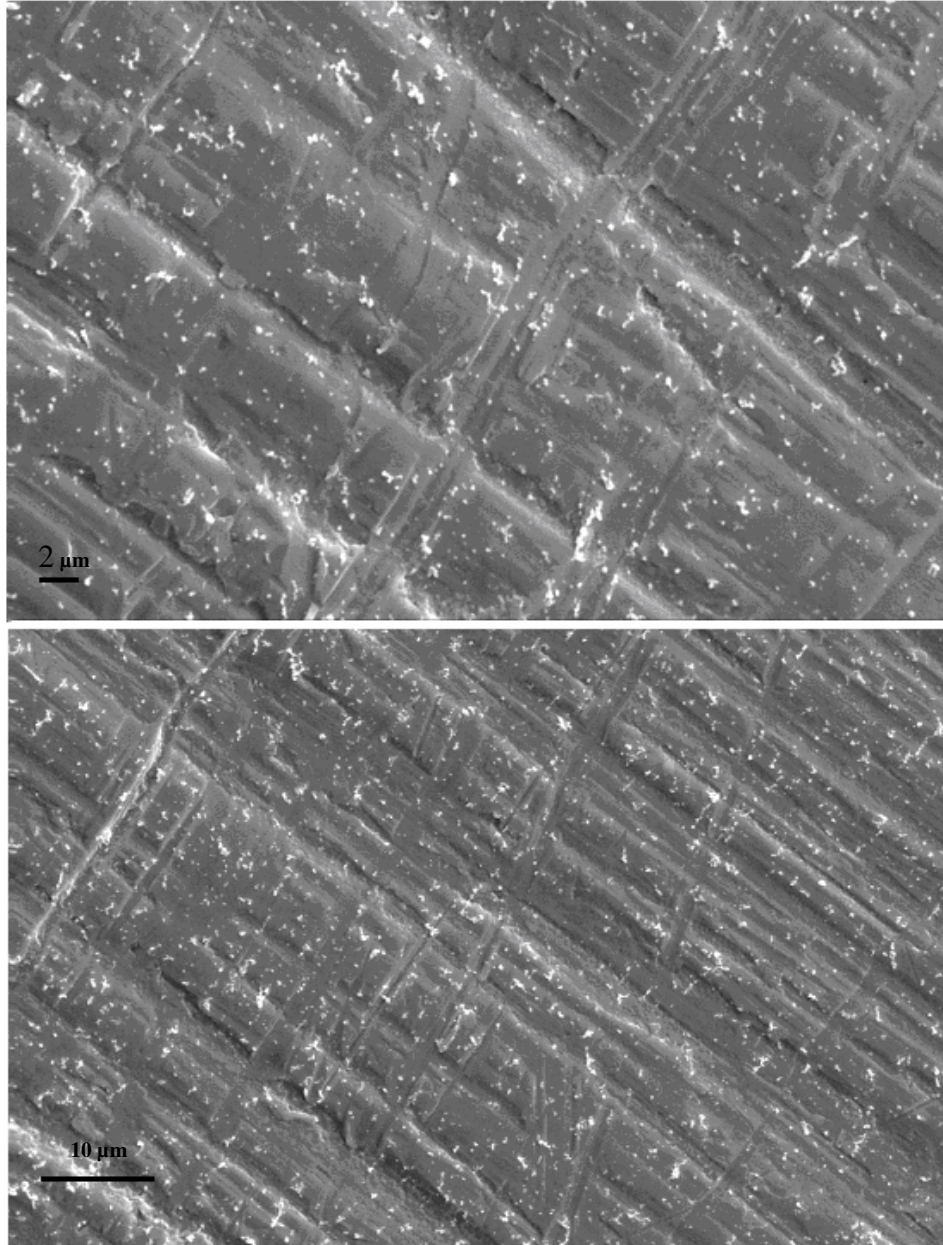


FIGURA 12 Eletromicrografia de varredura de *S. aureus* cultivado a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após seis horas de contato.

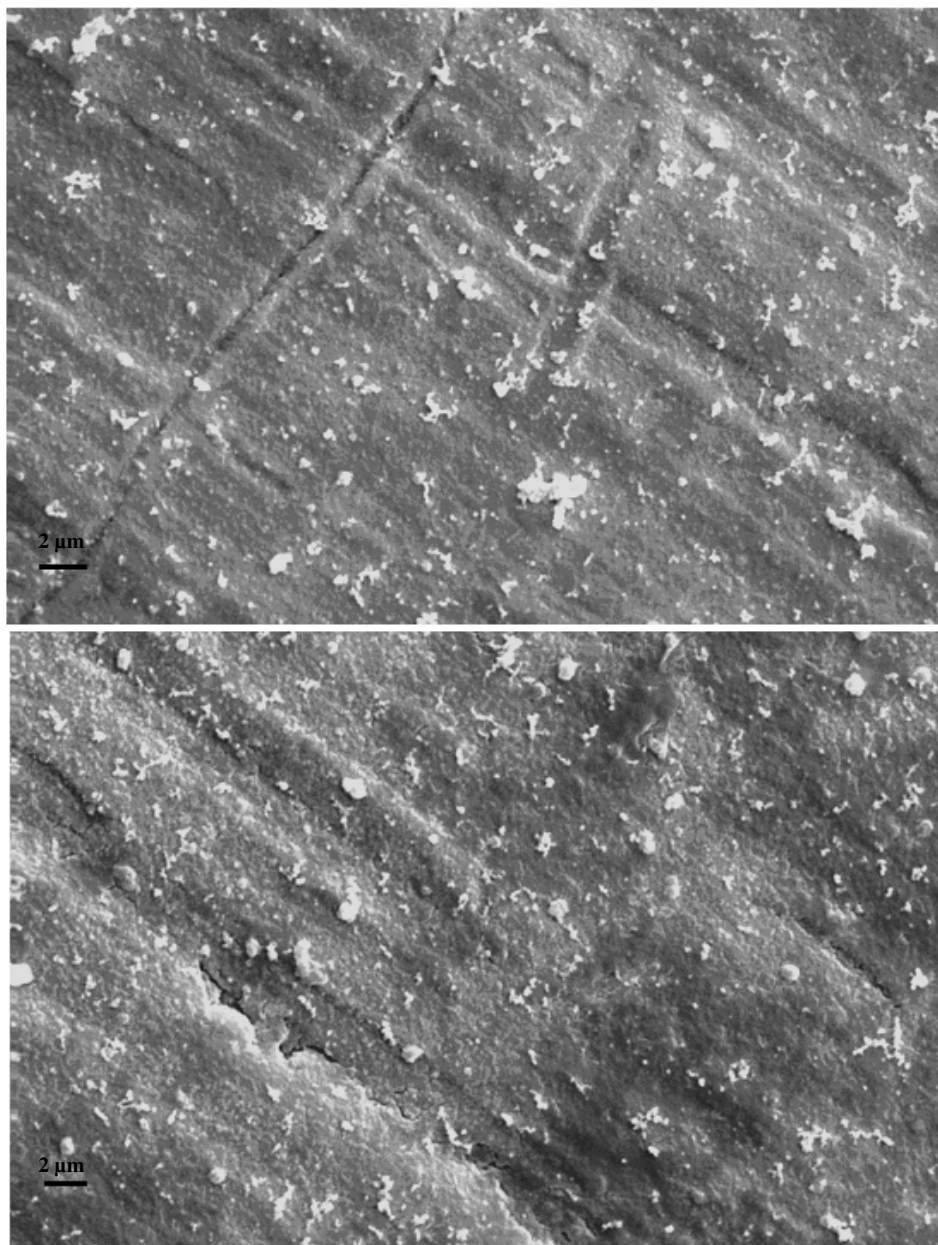


FIGURA 13 Eletromicrografia de varredura de *S. aureus* cultivado a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após dois dias de contato.

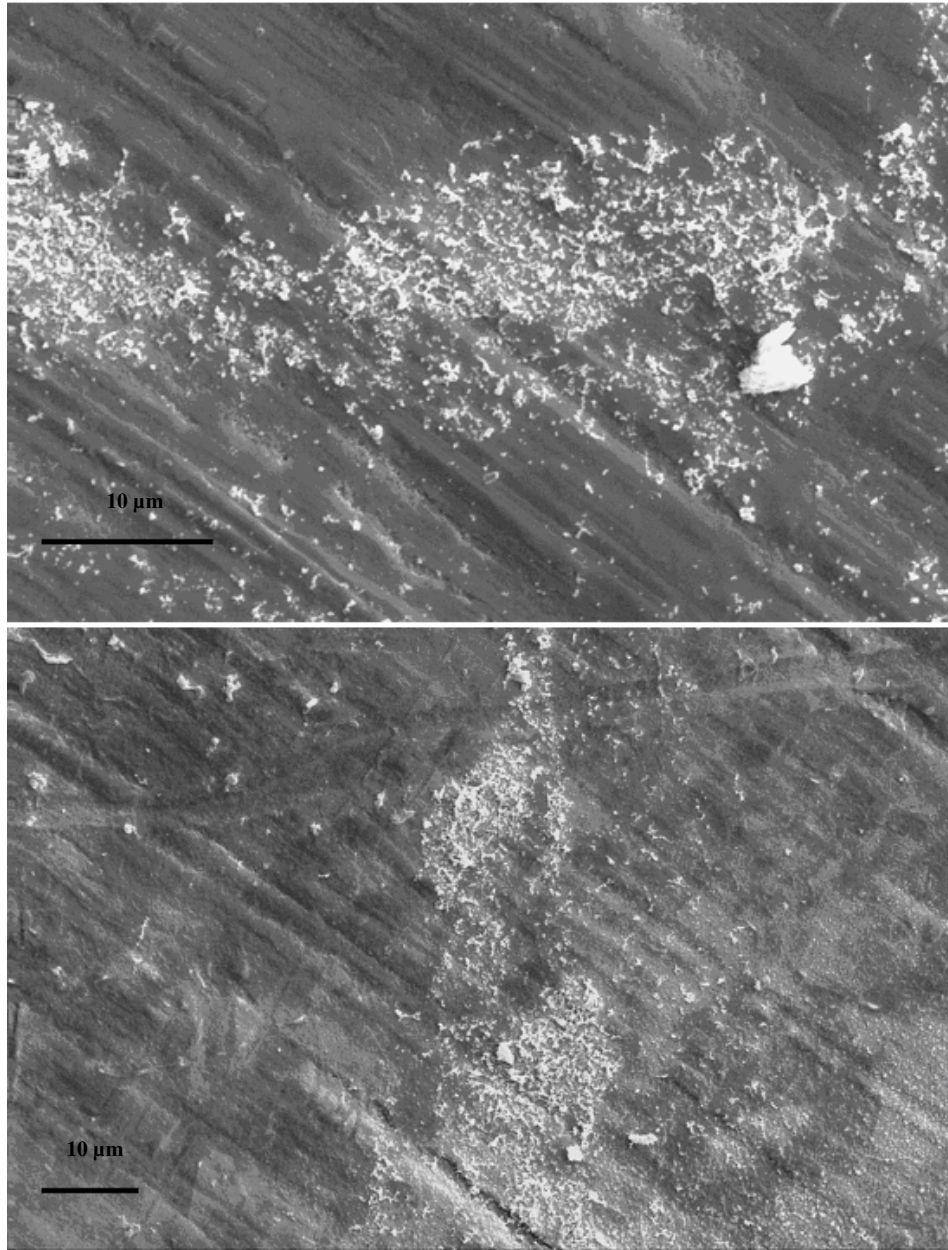


FIGURA 14 Eletromicrografia de varredura de *S. aureus* cultivado a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após dez dias de contato.

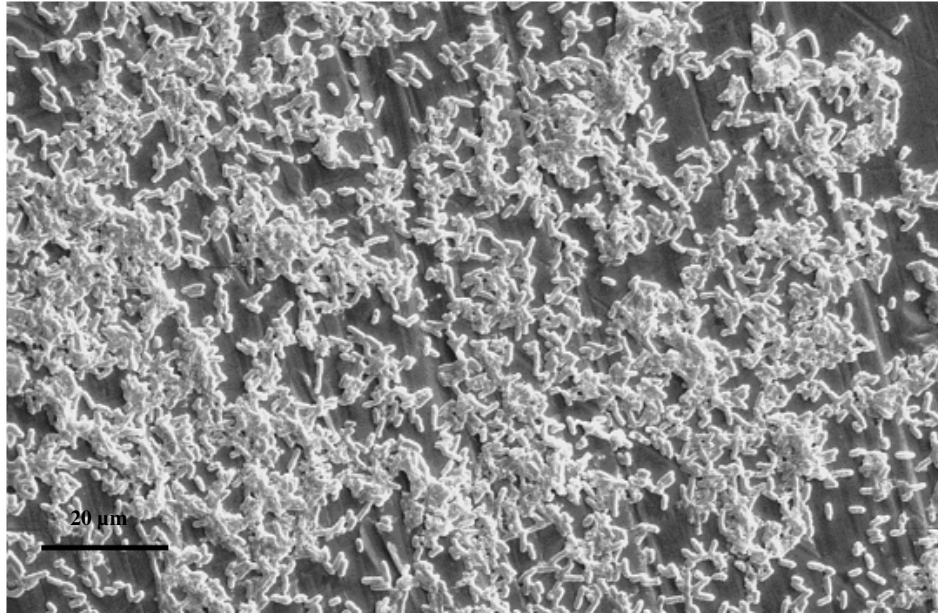


FIGURA 15 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* e *S. aureus* cultivados a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após seis horas de contato.

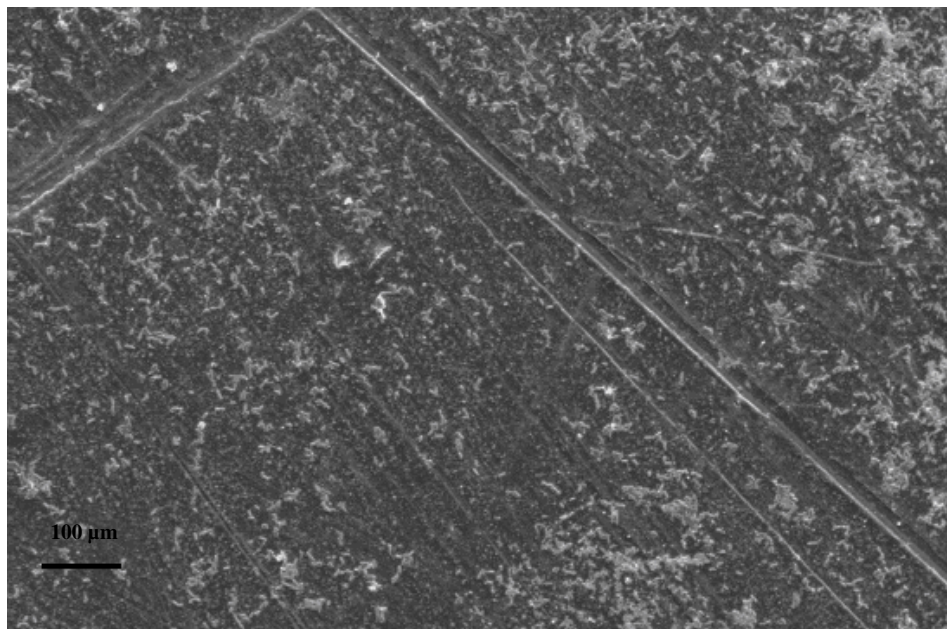


FIGURA 16 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* e *S. aureus* cultivados a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após dois dias de contato.

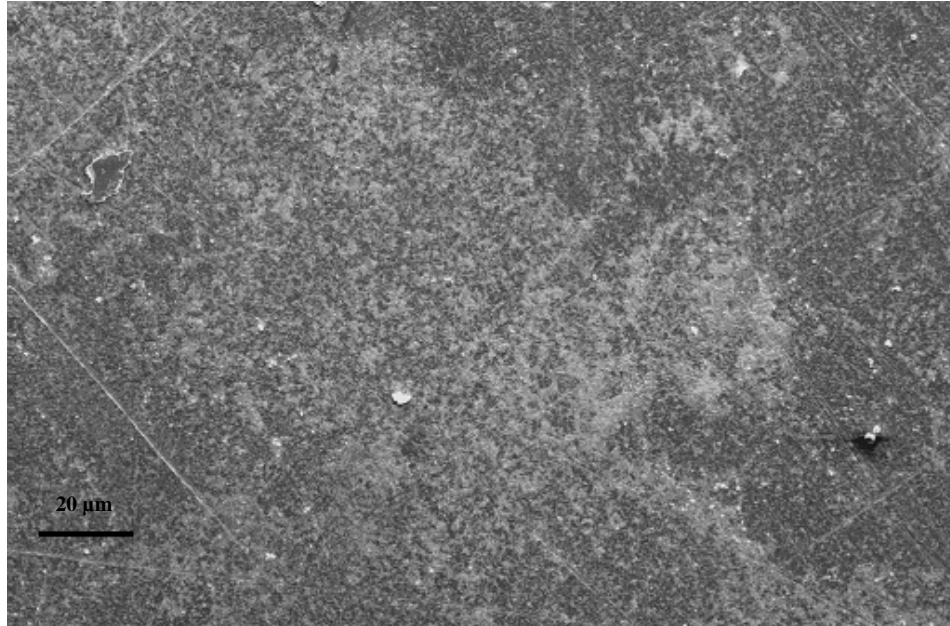


FIGURA 17 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* e *S. aureus* cultivados a 4°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após dez dias de contato.

Este ensaio se baseou na seguinte indagação: quais seriam as conseqüências do armazenamento de uma quantidade de leite cru contaminado por *S. aureus* e *A. hydrophila* em um tanque de refrigeração por expansão, no qual apenas seriam aplicados procedimentos de limpeza para a remoção de resíduos (representados, no ensaio, pela rinsagem dos cupons), sem, no entanto, serem conduzidos procedimentos de sanificação?

Em resposta a este questionamento, *S. aureus* e *A. hydrophila* foram capazes de se aderir ao aço inoxidável e formar biofilmes em várias das condições testadas, como anteriormente discutido.

A presença destas bactérias no estado planctônico foi elevada, indicando que, caso um biofilme se forme em um tanque de expansão, poderá haver uma quantidade de células suficientes para alterar as propriedades sensoriais do leite

cru e seus derivados, bem como torná-los inseguros ao consumo humano. Os riscos da presença destes microrganismos têm sido apresentados em diversos trabalhos (Tsai et al., 1997; Braun et al., 2001; Martins et al., 2002; Tiryaki & Tuncel, 2006).

A mais eficiente forma de se impedir a formação de um biofilme e a conseqüente ocorrência de tantos malefícios corresponde à prática constante de adequados procedimentos de higiene industrial, contemplando não apenas a remoção de resíduos, mas também a eliminação de células indesejáveis, por meio da sanitização (Chmielewski & Frank, 2003). Além disso, a obtenção higiênica do leite e o atendimento a demais itens que compõem as boas práticas de processamento de alimentos são imprescindíveis para o controle desses microrganismos na cadeia alimentar.

4.7 Considerações sobre a adesão inicial do microrganismo no aço inoxidável

O aço inoxidável, descoberto por Harry Brearley (Inglaterra, 1912), corresponde a uma liga composta por ferro e cromo. Em se tratando o AISI 304, o mais utilizado na indústria de alimentos, esta liga contém de 18%-20% de cromo; 8,0%-10,5% de níquel e o restante de ferro. O cromo presente nesta liga apresenta alta afinidade pelo oxigênio e, quando estes dois elementos se combinam, forma-se, na superfície do aço inoxidável, pelo fenômeno denominado passivação, uma fina camada de óxido de cromo, chamada de camada passiva. Este filme formado, com até 40 Angstrom de espessura, é o responsável pela característica de resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável. Dessa forma, quanto mais hidrofóbica for a célula, maior a sua capacidade de se ligar diretamente ao aço inox.

Esta hidrofobicidade, conforme já tratado, é conferida, principalmente, por fatores de virulência associados à adesão. Destaque é dado a pili, fimbrias e

flagelos, bem como à membrana externa em gram-negativos. Para microrganismos eletricamente carregados (cargas negativas), mais desfavorável será a sua ligação direta ao aço. Neste caso, a participação do filme condicionante, formado por diversos compostos e moléculas provenientes da fase aquosa, será determinante.

Na Figura 18 é apresentado um modelo proposto para o ancoramento das bactérias à superfície hidrofóbica do aço inoxidável.

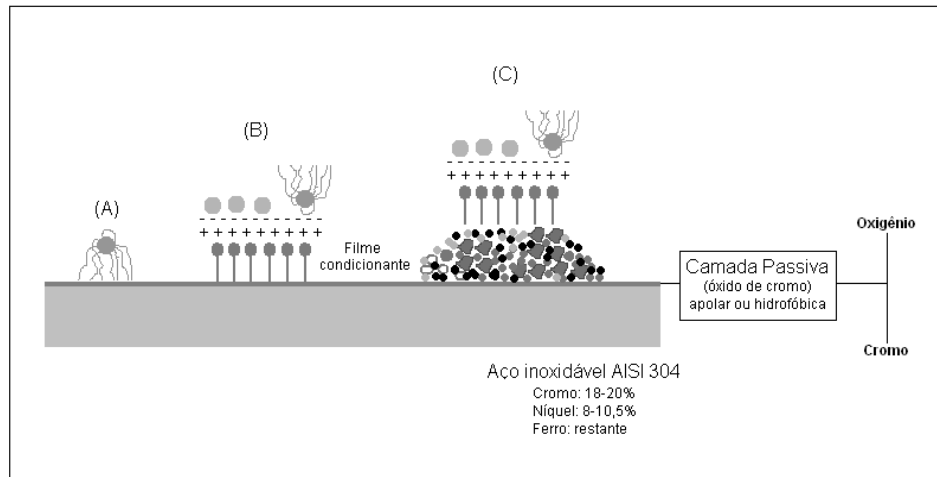


FIGURA 18 Esquema para a formação da camada passiva e para a adesão inicial de microrganismo diretamente ao aço inoxidável ou à camada ou filme condicionante. Em (A) são mostradas as interações hidrofóbicas e em (B) e (C), interações eletrostáticas, com participação do filme condicionante.

De acordo com a Figura 18, em A é apresentada a interação direta entre o microrganismo e a camada passiva do aço inoxidável. Microrganismos gram-negativos, como *A. hydrophila*, que apresentam, além de sua membrana externa, estruturas de adesão, com flagelos, poderiam se aderir dessa forma. Entretanto, a formação do filme condicionante, constituído por constituintes da fase aquosa, como minerais, lipídeos e proteínas, poderia intermediar o contato entre

microrganismo e aço. Caso estes constituintes tenham caráter anfipático (radical polar e apolar), poderiam se ligar ao aço inox por sua fração apolar e expor seu radical apolar (Figura 18 B e C), facilitando a adesão do microrganismo. No leite, estes constituintes seriam representados pela lecitina e pela caseína. *S. aureus*, gram-positivo e que não apresenta membrana externa ou estruturas para motilidade, como flagelos, tende a ser mais eletricamente carregado, com cargas negativas. Para microrganismos como estes, o filme condicionante pode exercer apoio vital na sua adesão. Esta seria também uma hipótese sobre a supremacia de *A. hydrophila* em aderir e formar biofilmes, em detrimento de *S. aureus*.

5 CONCLUSÃO

S. aureus, em monocultivo, formou biofilme a 18°C e a 7°C. Para 4°C, apenas foi observado um processo de adesão. A presença de *A. hydrophila* reduziu o desempenho de *S. aureus*. Nesta condição de cultivo multiespécie, apenas houve formação de biofilme a 18°C.

A. hydrophila, tanto em monocultivo quanto em presença de *S. aureus*, formou biofilme em todas as condições pesquisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTARRIBA, M.; MERINO, S.; GAVÍN, R.; CANALS, R.; RABAAN, A.; SHAW, J.G.; TOMÁS, J.M. A polar flagella operon (flg) of *Aeromonas hydrophila* contains genes required for lateral flagella expression. **Microbial Pathogenesis**, v.34, p.249-259, 2003.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43p.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal 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.
- 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 SmaI digestion. **Food Control**, v.19, p.200-207, 2008.
- ARCURI, E.F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, v.9, n.53, p.40-45, 2000.
- AREVALO-FERRERO, O. C.; REIL, G.; GÖRG, A.; EBERL, L.; RIEDEL, K. Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.87-114, 2005.
- BANKS, M.K.; BRYERS, J.D. Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, p.1974-1979, 1991.
- BARNES, L.M.; LO, M.F.; ADAMS, M.R.; CHAMBERLAIN, A.H. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.4543-4548, 1999.

BÉCHET, M.; BLONDEAU, R. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.1072-1078, 2003.

BELOIN, C.; GHIGO, J.M. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. **Trends Microbiology**, v.13, p.16–19, 2005.

BOS, R.; van der MEI, C.; BUSSCHER, H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.179-229, 1999.

BOSSOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electron microscopy**. 2.ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670p.

BOULANGE-PETERMANN, L.; JULLIEN, C.; DUBOIS, P.E.; BENEZECH, T.; FAILLE, C. Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. **Biofouling**, v.20, p.25-33, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite fluído a granel de uso industrial. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1996.

BRAUN, P.; SUTHERLAND, J.P. Predictive modelling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of selected Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.257-266, 2005.

BRAUM, P.; BALZER, G.; FEHLHABER, K. Activity of bacterial lipases at chilling temperatures. **Food Microbiology**, v.18, p.211-215, 2001.

BULHÕES, C.C.C.; ROSSI JUNIOR, O.D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.3, 320-324, 2002.

CARNEIRO, M.S.; ROSSI JUNIOR, O.D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.271-276, 2006.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders. **International Dairy Journal**, v.7, p.255–275, 2003.

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

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.299–305, 2005.

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

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

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.G.; GEESEY, K.G.; LADD, P.I.; NICKEL, J.C.; DASCUP TAM, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v.41, p.435-464, 1987.

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

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

CUCARELLA, C; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2888–2896, 2001.

DASKALOV H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v.17, n.6, p.474-483, 2006.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, v.8, p.881-890, 2002.

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

DAVIES, D.G.; CHAKRABARTY, A.M.; GEESEY, G.G. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.1181-1186, 1993.

DAVIES, D.G.; GEESEY, G.G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.860–867, 1995.

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v.280, p.295-298, 1998.

DE BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.1-17, 2001.

DEMILLY, M.; BRÉCHET, Y.; BRUCKERT, F.; BOULANGÉ, L. Kinetics of yeast detachment from controlled stainless steel surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.51, p.71-79, 2006.

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

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com confeites: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.291-296, 2005.

FREITAS, A.C.; NUNES, M.P.; MILHOMEM, A.M.; RICCIARDI, I.D. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.62-65, 1993.

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, p.187-194, 2005.

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

GAVÍN, A.; RABAAN, A.A.; MERINO, S.; TOMÁS, J.M.; GRYLLOS, I.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.43, p.383-397, 2002.

GIAOURIS, E.D.; NYCHAS, G-J. E. The adherence of *Salmonella Enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, v.23, p.747-752, 2006.

GIOVANNACCI, I.; ERMEL, G.; SALVAT, G.; VENDEUVRE, J.L.; BELLON-FONTAINE. Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.1-10, 2000.

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

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

HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v.24, p.380-392, 2007.

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, p.585-591, 2007.

- HEYDORN, A.; NIELSEN, A.T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v.146, p.395–407, 2000.
- HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.154-153, 1997.
- JAMES, A.; BEAUDETTE, L.; COSTERTON, J.W. Interspecies bacterial interactions in biofilms. **Journal Ind. Microbiology**, v.15, p.257–262, 1995.
- JENKINSON, H.F.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, v.9, p.9-10, 2001.
- JOHNSON, L.R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v.251, p.24-34, 2007.
- JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. M. Update of the genus *Aeromonas*. **ASM News**, v.66, p.218–223, 2000.
- JORGENSEN, H.J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K.S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p.267-272, 2005.
- KINGSHOTT, J.; WEI, D.; BAGGE-RAVN, N.; GADEGAARD; GRAM, L. Covalent attachment of poly(ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion. **Langmuir**, v.19, p.6912–6921, 2003.
- KIROV, S.M.; HUI, D.S.; HAYWARD, L.J. Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **Journal of Food Protection**, v.56, p.306-312, 1993.
- KIROV, S.M. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.224, p.151-159, 2003.
- KONG, K-F.; VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.133-139, 2006.

KREPSKY, N.; ROCHA FERREIRA, R.B.; FERREIRA NUNES, A.P.; CASADO LINS, U.G.; SILVA FILHO, F. MATTOS-GUARALDI, A.L.; NETTO DOS SANTOS, K.R. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. **Current Microbiology**, v.46, p.280-286, 2003.

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, p.227–236, 2003.

LAI, C.C.; SHIAO, C.C.; LU, G.D.; DING, L.W. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in a burn patient. **Burns**, v.33, p.255-257, 2007.

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

LEE, J.; PAGE, R.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; PALERMINO, J.M.; ZHANG, X.S.; DOSHI, O.; WOOD, T.K.; PETI, W. Structure and Function of the *Escherichia coli* Protein YmgB: A Protein Critical for Biofilm Formation and Acid-resistance. **Journal of Molecular Biology**, v.373, p.11-26, 2007.

LUES, J.F.R.; TONDER, I.V. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**, v.18, p.326-332, 2007.

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

MADDULA, V.S.R.K.; ZHANG, Z.; PIERSON, E.A; PIERSON, L.S. Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30-84. **Microbial Ecology**, v.52, n.2, 2006.

MANO, S.B.; ORDOÑEZ, J.A.; FERNANDO, G.D.G. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. **Food Microbiology**, v.17, p.657-669, 2000.

MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces
Electrochimica Acta, v.52, p.7670-7680, 2007.

MARCHAND, S.; COUDIJZER, K.; DEWETTINCK, M.H.K.; BLOCK, J.D.
Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial
origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v.18, p.514-519, 2007.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas*
isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical
Microbiology**, v.35, p.237-242, 2002.

MASTRONICOLIS, S.K.; GERMAN, J.B.; MEGOULAS, N.; PETROU, E.;
POKA, P.; SMITH, G.M. Influence of cold shock on the fatty-acid composition
of different lipid classes of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*.
Food Microbiology, v.15, p.299-306, 1998.

MATTICK J.S. Type IV pili and twitching motility. **Annual Review
Microbiology**, v.56, p.289-314, 2006.

MEYLHEUC, T.; METHIVIER, C.; RENAULT, M.; HERRY, J.M.;
PRADIER, C.M.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption on stainless steel
surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive
bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*.
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.52, p.128-137, 2006.

NEYTS, K.; HUYS, G.; UYTENDAELE, M.; SWINGS, J.; DEBEVERE, D.J.
Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods.
Letters in Applied Microbiology, v.31, p.359-363, 2000.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO,
F.; VILELA, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus*
and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**,
v.124, p.187-191, 2007.

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, p.178-185, 2008.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial
development. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.49-79, 2000.

PARIZZI, S.Q.F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência.** 1998. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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 Food Microbiology**, v.109, p.88-96, 2006.

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

RABAAN, A.A.; GRYLLOS, I.A.; TOMÁS, J.M.; SHAW, J.G. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEP-2 cells. **Infection and Immunity**, v.43, p.4257-4267, 2001.

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

RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.J.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, v.11, p.94-100, 2003.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, 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.

RYDER, C.; BYRD, M.; WOZNIAK, D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p.644-648, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS/ETS User's Guide**. Version 6. 2.ed. Cary: SAS Intitute, 1995.

SAUER, K.; CAMPER, A.K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. **Journal Bacteriology**, v.183, p.6579–6589, 2001.

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

SAWYER, L.K.; HERMANOWICZ, S.W.. Detachment of biofilm bacteria due to variations in nutrient supply. **Water Science and Technology**, v.37, p.211-214, 1998.

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

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, p.1-9, 1990.

SHENG, X.; TING, Y.P.; PEHKONEN, S.O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.310, p.661-669, 2007.

SHIMADA,T.; SAKAZAKI, R.; SUZUKI, K. Peritrichous flagella in mesophilic strains of *Aeromonas*. **Japan Journal Medical Science Biology**, v.43, p.141–145, 1985.

SKERKER, J.M.; BERG, H.C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. **Proceedings of National Academic of Science**, v.98, p.6901–6904, 2001.

SUÑEN E.; ARISTIMUÑO C.; FERNANDEZ-GALIAN B. Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4 C. **Food Research International**, v.36, n.2, p.111-116, 2003.

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

SURMAN, S.; MORTON, G.; KEEVIL, B. Biofilms: an overview. **PHLS Microbiology Digest**, v.13, n.1, p.33-38, 1996.

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

STOPFORTH, J.D.; SAMELIS, J.; SOFOS, J.N.; KENDALL, P.A.; SMITH, G.C. Influence of organic acid concentration on survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in beef carcass wash water and on model equipment surfaces. **Food Microbiology**, v.20, p.651-660, 2003.

TANEJA N.; KHURANA S.; TREHAN A.; MARWAHA R.K.; SHARMA M. An outbreak of hospital acquired diarrhea due to *Aeromonas sobria*. **Indian Journal of Pediatric**, v.41, p.912-916, 2004.

TATINI, S.R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxin a in milk. **Journal of Milk and Food Technology**, v.36, p.559–563, 1973.

TIRADO, C.; SCHIMDT, K. WHO surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. **Journal of Infection**, v.43, p.80-84, 2001.

TIRYAKY, G.G.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, p.329-336, 2006.

TSAI, G.J.; TSAI, F.C.; KONG, Z.L. Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.111-116, 1997.

Van der MEI, H.C.; Van der BELT-GRITTER, B.; POWELS, P.H.; MARTINEZ, B.; BUSSCHER, H.J. Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins—a study in recombinant lactobacilli. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.28, p.127-134, 2003.

VANHAECKE, E.; REMON, J.P.; MOORS, M.; RAES, F.; RUDDER, D.; PETEGHEM, A.V. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.3, p.788-795, 1990.

ZOTTOLA, E.A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, v.48, n.7, p.107-114, 1994.

WIJNKER, J.J.; KOOP, G.; LIPMAN, L.J.A. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. **Food Microbiology**, v.23, p.657-662, 2006.

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, p.9-16, 1995.

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

ANEXO

	Página
TABELA 1 Resumo da análise de variância para crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Aeromonas hydrophila</i> , em log UFC/cm ² , em função dos tratamentos estudados.....	74
TABELA 2 Valores médios de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , em log UFC/cm ² , cultivado isoladamente e na presença de <i>Aeromonas hydrophila</i> , em função das temperaturas estudadas, para cada tempo analisado.....	75
TABELA 3 Valores médios de crescimento de <i>Aeromonas hydrophila</i> , em log UFC/cm ² , cultivada isoladamente e na presença de <i>Staphylococcus aureus</i> , em função das temperaturas estudadas, para cada tempo analisado.....	76
FIGURA 1 Valores médios de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , em log UFC/cm ² , cultivado isoladamente, em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.....	77

FIGURA 2 Valores médios de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , em log UFC/cm ² , cultivado na presença de <i>Aeromonas hydrophila</i> , em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.....	78
FIGURA 3 Valores médios de crescimento de <i>Aeromonas hydrophila</i> , em log UFC/cm ² , cultivada isoladamente, em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.....	79
FIGURA 4 Valores médios de crescimento de <i>Aeromonas hydrophila</i> , em log UFC/cm ² , cultivada na presença de <i>Staphylococcus aureus</i> , em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.....	80

TABELA 1 Resumo da análise de variância para crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila*, em log UFC/cm², em função dos tratamentos estudados.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio (p-valor)	
		<i>S. aureus</i>	<i>A. hydrophila</i>
Biofilme (B)	1	16,4117 (p=0,0002)	1,3470 (p=0,0755)
Temperatura (T)	2	25,8475 (p<0,0001)	6,2345 (p=0,0019)
B x T	2	10,2307 (p=0,0003)	5,2745 (p=0,0029)
Erro de parcela	6	0,2403	0,2924
Dias (D)	4	4,3310 (p<0,0001)	19,7333 (p<0,0001)
D x B	4	1,7703 (p=0,0002)	1,1454 (p=0,0008)
D x T	8	1,0740 (p=0,0009)	1,0042 (p=0,0003)
D x B x T	8	0,8764 (p=0,0031)	0,7352 (p=0,0021)
Erro de subparcela	24	0,2107	0,1657
CV (%)		8,87	5,81
Pr < W		0,2416	0,9876

TABELA 2 Valores médios de crescimento de *Staphylococcus aureus*, em log UFC/cm², cultivado isoladamente e na presença de *Aeromonas hydrophila*, em função das temperaturas estudadas, para cada tempo analisado.

Tempo (Dias)	Biofilme	Temperaturas		
		4°C	7°C	18°C
2	<i>S.aureus</i>	3,91 a A	4,03 a A	5,51 a A
	<i>S.aureus</i> + <i>A. hydrophila</i>	4,54 a A	3,83 a A	4,13 a A
4	<i>S.aureus</i>	2,90 a A	5,02 a B	7,07 a A
	<i>S.aureus</i> + <i>A. hydrophila</i>	4,68 a A	4,05 a A	4,89 b A
6	<i>S.aureus</i>	3,86 a B	6,14 a A	7,43 a A
	<i>S.aureus</i> + <i>A. hydrophila</i>	5,10 a AB	3,80 b B	6,34 a A
8	<i>S.aureus</i>	4,42 a B	7,03 a A	7,91 a A
	<i>S.aureus</i> + <i>A. hydrophila</i>	4,55 a AB	3,57 b B	6,03 a A
10	<i>S.aureus</i>	4,57 a B	7,41 a A	8,23 a A
	<i>S.aureus</i> + <i>A. hydrophila</i>	3,67 a B	3,80 b B	6,76 a A
Erro padrão da média		0,32		
CV (%)		8,87		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância; médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna em cada tempo analisado, não diferem entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

TABELA 3 Valores médios de crescimento de *Aeromonas hydrophila*, em log UFC/cm², cultivada isoladamente e na presença de *Staphylococcus aureus*, em função das temperaturas estudadas, para cada tempo analisado.

Tempo (Dias)	Biofilme	Temperaturas		
		4°C	7°C	18°C
2	<i>A. hydrophila</i>	4,08 a A	5,14 a A	5,67 a A
	<i>A. hydrophila</i> + <i>S. aureus</i>	4,43 a B	5,36 a AB	6,49 a A
4	<i>A. hydrophila</i>	5,24 a B	5,41 a B	7,85 a A
	<i>A. hydrophila</i> + <i>S. aureus</i>	6,08 a A	5,97 a A	7,08 a A
6	<i>A. hydrophila</i>	7,30 a AB	6,45 a B	8,69 a A
	<i>A. hydrophila</i> + <i>S. aureus</i>	7,58 a A	6,52 a A	6,91 b A
8	<i>A. hydrophila</i>	7,88 a AB	7,48 a B	9,36 a A
	<i>A. hydrophila</i> + <i>S. aureus</i>	8,18 a A	7,66 a A	6,76 b A
10	<i>A. hydrophila</i>	8,27 a B	8,04 a B	10,34 a A
	<i>A. hydrophila</i> + <i>S. aureus</i>	8,15 a A	8,31 a A	7,24 b A
Erro-padrão da média			0,29	
CV (%)			5,81	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância; médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna em cada tempo analisado, não diferem entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

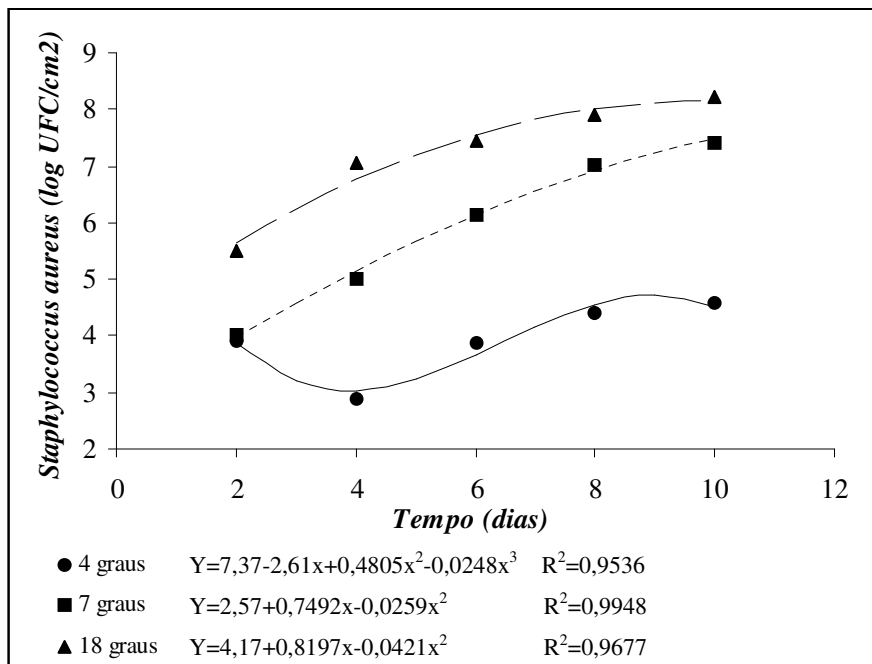


FIGURA 1 Valores médios de crescimento de *Staphylococcus aureus*, em log UFC/cm², cultivado isoladamente, em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.

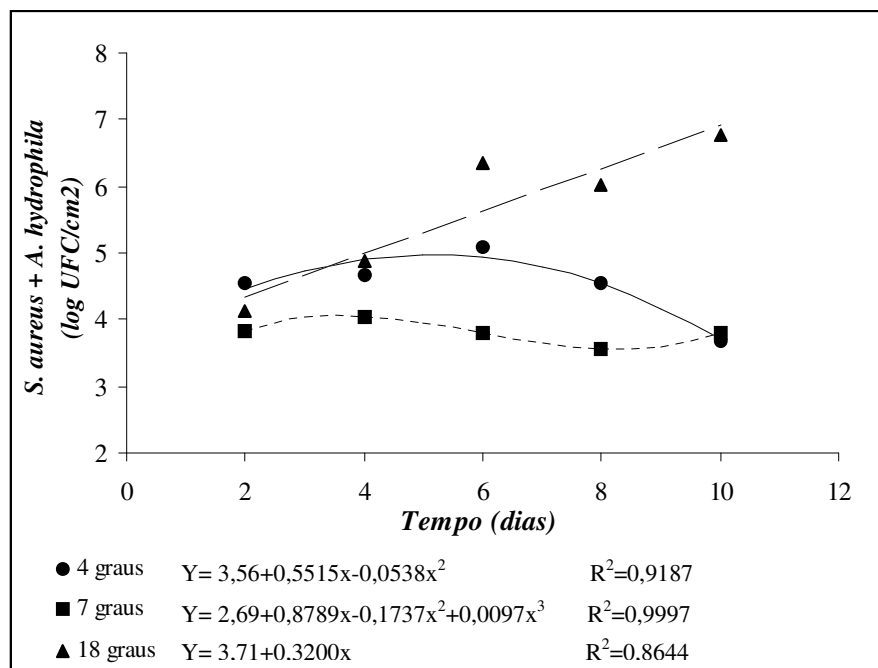


FIGURA 2 Valores médios de crescimento de *Staphylococcus aureus*, em log UFC/cm², cultivado na presença de *Aeromonas hydrophila*, em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.

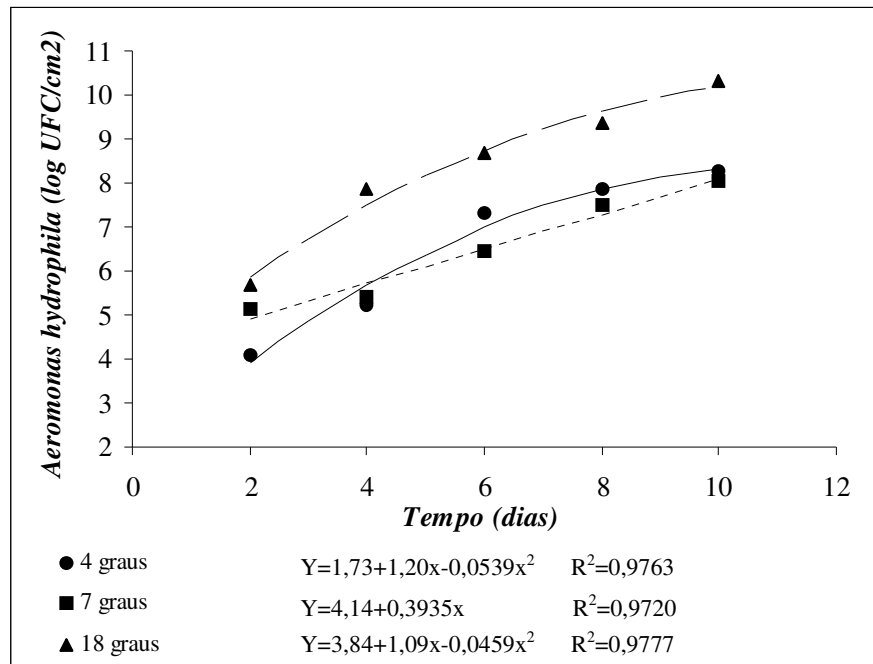


FIGURA 3 Valores médios de crescimento de *Aeromonas hydrophila*, em log UFC/cm², cultivada isoladamente, em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.

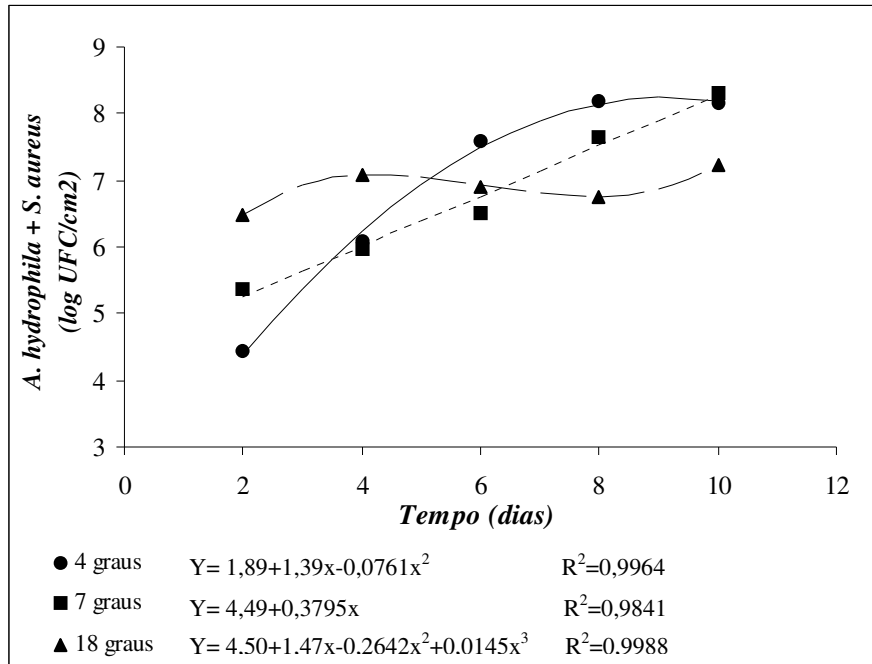


FIGURA 4 Valores médios de crescimento de *Aeromonas hydrophila*, em log UFC/cm², cultivada na presença de *Staphylococcus aureus*, em função dos tempos estudados, para cada temperatura analisada.