

HAMILTON MENDES DE FIGUEIREDO

**ADESÃO BACTERIANA EM MODELO DE CIRCUITO
DE PROCESSAMENTO DE LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

AGRADECIMENTO

A Deus, por ter-me dado condições para realizar esta tarefa.

À Universidade Federal de Viçosa, por permitir a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Nélio José de Andrade, pela colaboração em todos os momentos.

Ao professor Frederico José Vieira Passos, por ter autorizado que os experimentos fossem realizados no Laboratório de Microbiologia e Processos Fermentativos.

Ao professor Luiz Antônio Minin, pelo auxílio técnico prestado.

A todos os demais professores que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, pelos momentos de lazer que compartilhamos.

BIOGRAFIA

HAMILTON MENDES DE FIGUEIREDO, filho de Maria Daíde Mendes de Figueiredo e Humberto Malato de Figueiredo, nasceu em Ponta de Pedras, no Estado do Pará, em 24 de maio de 1961.

Em 1989, graduou-se em Engenharia Agrônômica, pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém-PA.

Em setembro de 1994, concluiu o curso de Especialização em Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal do Pará, Belém-PA.

Em outubro de 1997, concluiu o Programa de Pós-Graduação, em de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Em março de 1997, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Bactérias deterioradoras e enzimas termorresistentes	3
2.2. Biofilmes microbianos	7
2.2.1. Teorias da formação do biofilme	7
2.2.2. Fatores que influenciam a adesão bacteriana	11
2.2.3. Composição do biofilme	14
2.2.4. Matriz extracelular	15
2.2.5. Moléculas e apêndices celulares envolvidos na adesão	17
2.2.6. Locais onde o biofilme pode se formar	20
2.2.7. Ecologia dos biofilmes	21
2.2.8. Dinâmica do biofilme	26
2.2.9. Adesão do esporo bacteriano	27
2.3. Biofilmes em indústrias de leite	29
2.4. Importância dos biofilmes na indústria láctea	30
2.5. Inativação de microrganismos aderidos	31

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Fatores avaliados na adesão bacteriana em aço inoxidável	34
3.2. Microrganismos e meio de cultura	34
3.3. Ativação dos microrganismos	35
3.4. Processo de adesão	35
3.5. Higienização do modelo	38
3.6. Delineamento experimental	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Influência da espécie bacteriana na adesão em aço inoxidável	41
4.2. Efeito da temperatura de refrigeração	50
4.3. Efeito da velocidade de circulação do leite	54
4.4. Influência da concentração de bactérias na adesão	57
4.5. Influência do tempo de incubação do leite inoculado com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre o processo de adesão	60
5. RESUMO E CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RESUMO

FIGUEIREDO, Hamilton Mendes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2000. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite.** Professor Orientador: Nélio José Andrade. Professores Conselheiros: Frederico José Vieira Passos e Luiz Antônio Minin.

Para entender melhor a adesão bacteriana em superfícies para processamento de alimentos, uma série de experimentos foi efetuada num modelo de linha de circulação de leite, equipado com cupons de prova em aço inoxidável, AISI 304, nas formas de T, cotovelo 90° e cilíndrica. Avaliou-se, a adesão de *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Bacillus cereus* NCTC 11145, nas formas vegetativa e esporulada, antes e após a circulação do leite pelo modelo. Os números de bactérias aderidas antes da circulação do leite pelo modelo apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que 24,60% dos esporos de *B. cereus* aderiram, sua forma vegetativa mais esporulada aderiu 2,21% e *P. aeruginosa* e o *E. faecium*, aderiram 5,83 e 0,57%, respectivamente. Após a circulação do leite, os percentuais de adesão foram de 4,10, 2,30, 5,36, 5,51, para *B. cereus* na forma esporulada, *B. cereus* (esporos e células vegetativas), *P. aeruginosa* e *E. faecium*, respectivamente. No experimento que avaliou o efeito da temperatura de armazenamento do leite na adesão bacteriana, observaram-se mudanças nas porcentagens de adesão. *P. aeruginosa* apresentou maior

capacidade de adesão a 18 °C, antes da circulação do leite pelo modelo, quando comparada com 10 °C e 5 °C. Já após a circulação do leite os percentuais de adesão obtidos para as diferentes temperaturas foram bastante semelhantes. Com relação à influência da velocidade de circulação do leite no modelo, verificou-se que a 0,5 m/s permaneceram aderidas aos cupons de prova 10,7% das células, enquanto que nas velocidades de 1,0 e 1,5 m/s as porcentagens de adesão foram de 5,40 e 4,90, respectivamente. Quando foi avaliada a influência da concentração de bactérias em relação a adesão, verificou-se que maiores concentrações de bactérias permitem maior número de células aderidas aos cupons, porém das células inicialmente aderidas a maior parte é removida pela circulação do leite a 1 m/s, o que fez com que as porcentagens de adesão final fossem de 5,36, 4,92 e 5,83, respectivamente para as concentrações bacterianas de $9,3 \times 10^5$ UFC/mL, $2,2 \times 10^5$ UFC/mL e $2,9 \times 10^4$ UFC/mL. A influência do tempo de incubação do leite sobre a adesão mostrou que aumentando o período de incubação ocorre maior proliferação bacteriana com conseqüente aumento do número de bactérias aderidas, porém a remoção de células pelo fluxo de leite é maior nos biofilmes com alta porcentagem de células aderidas, como o obtido para o tempo de 48 horas (48,70%) quando comparado com as adesões obtidas para os tempos de 12 e 24 horas.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Hamilton Mendes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, June 2000. **Bacterial adhesion in circuit model of milk processing.** Adviser: Nélío José de Andrade. Committee members: Frederico José Vieira Passos and Luiz Antônio Minin.

With the objective of understanding the factors involved in the bacterial adhesion to the equipments for food processing were accomplished a series of experiments. In the evaluation of the capacity of adhesion of *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *Bacillus cereus* NCTC 11145 in spore and vegetative cells, before the circulation of the milk in the simulator, it was verified that the adhesion percentage, in stainless steel, for spore of *Bacillus cereus* was of 24.60%, while its spore more vegetative cells presents a value of 2.21%. The adhesion percentages for *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecium* were of 5.83% and 0.57%, respectively. With relationship to the adhesion after the circulation of the milk in the simulator was observed that the spore form and spore more vegetative cells of *Bacillus cereus* presented 4.10% and 2.3%, respectively, while for *P. aeruginosa* the found value was of 5.36% and for *E. faecium* the adhesion percentage was of 5.51%. When experiment was accomplished with the objective of evaluating the effect of the temperature of refrigeration of the milk

in the bacterial adhesion, changes were observed in the adhesion percentages. *P. aeruginosa*, presented larger adhesion capacity for 18°C, before the circulation of the milk for the model, when compared with 10°C and 5°C. After the circulation of the milk the percentile of adhesion obtained for the different temperatures were plenty similar. With relationship to the influence of the velocity of circulation of the milk in the model, it was verified that at 0.5 m/s 10.7% of the cells was adhered in the coupon, while in the velocities of 1,0 m/s and 1.5 m/s the adhesion percentages were of 5.40 and 4.90, respectively. When the influence of the bacterial concentration was evaluated in relation to adhesion, was verified that larger concentrations of bacterias allow larger number of cells adhered to the coupons, even of the cells initially adhered most is removed by the circulation of the milk to 1 m/s, with that the percentages of final adhesion went of 5.36, 4,92 and 5.83, respectively for the bacterial concentrations of 9.3×10^5 UFC/ml, 2.2×10^5 UFC/ml and 2.9×10^4 UFC/ml. The influence of the time of incubation of the milk about the adhesion showed that increasing the incubation period happens larger bacterial proliferation with consequent increase of the number of adhered bacterias, even so biofilme with high percentage of cells stuck as obtained it for the time of 48 hours (48.7%) they have a larger removal of cells for the flow of the milk when compared with the adhesions obtained for the times of 12 and 24 hours.

1. INTRODUÇÃO

As indústrias têm processado uma quantidade de alimentos cada vez maior, na tentativa de suprir o mercado crescente. Com o aumento da capacidade de processamento, vários problemas têm surgido. Um deles é a questão da perda pós-processamento ou diminuição da vida de prateleira, em função da contaminação do alimento na própria linha de produção.

Apesar de os métodos de sanificação aplicados na indústria serem bastante eficazes, há casos em que a higienização, realizada deficientemente, não remove microrganismos e sujidades, o que favorece a adesão de microrganismos nos equipamentos e utensílios. O alimento que circular nessa linha de produção poderá sofrer contaminação, portanto, no final do período de produção, poderá haver um grau de contaminação do equipamento bastante elevado, o que pode levar ao aumento do número de microrganismos aderidos. Uma vez que esses microrganismos estejam aderidos ou formem biofilmes, haverá resistência à remoção pelos processos de sanificação.

A questão da formação de biofilmes por bactérias patogênicas tem sido estudada, com a finalidade de compreender melhor os mecanismos envolvidos nessa adesão e, desta maneira, poder controlá-los.

Os microrganismos apresentam diferenças entre si na capacidade de aderir à superfície de equipamentos. Portanto, alguns são mais resistentes ao tratamento térmico e podem formar colônias na linha de produção. Outros

fatores diferenciam os microrganismos com relação à capacidade de formar biofilmes, como é o caso da resistência a sanificantes, à quantidade relativa de uma determinada espécie no alimento, entre outros. Os microrganismos, uma vez aderidos à superfície de equipamentos, apresentam a capacidade de liberar células, contaminando o alimento. Este tipo de problema é especialmente importante em indústrias de processamento de leite, já que este produto é, normalmente, pasteurizado e, em países como o Brasil, apresenta um número de microrganismos bastante elevado.

Microrganismos deterioradores aderidos à linha de produção podem resultar em leite processado com alto grau de contaminação microbiana, além de haver também a possibilidade de contaminação com microrganismos patogênicos.

Neste trabalho, objetivou-se estudar a adesão de bactérias deterioradoras e quantificar a contaminação resultante, em um modelo de processo que simula uma linha de circulação de leite. Desta maneira, conhecendo os microrganismos que apresentam maior capacidade de adesão, será possível distinguir melhor os fatores que levam a uma grande contaminação do leite processado e, conseqüentemente, controlá-los, a fim de obter um produto de melhor qualidade, mais seguro e com uma vida de prateleira maior.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bactérias deterioradoras e enzimas termorresistentes

O leite é um excelente meio de cultura, pois contém uma microbiota complexa e numerosa, que depende de fatores como condições higiênicas durante a ordenha, higiene dos utensílios, cuidados com o animal, entre outros (JAY, 1994).

A microbiota termodúrica, constituída pelos organismos sobreviventes à pasteurização lenta (63° C/30 minutos), é representada, principalmente, pelos gêneros *Microbacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Clostridium* (FRANK et al., 1992).

As bactérias psicrotróficas são capazes de crescer à temperatura de refrigeração, entre 2 e 7° C, o que as torna importantes para a vida de prateleira dos produtos armazenados sob refrigeração; porém, sua faixa ótima de crescimento está entre 20 e 25 °C (FRANK et al., 1992). A manutenção do leite cru por períodos prolongados sob refrigeração propicia a proliferação de organismos psicrotróficos, independente de sua temperatura ótima de crescimento (ROBINSON, 1990).

Organismos psicrotróficos formadores de esporos dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* têm despertado interesse considerável em leite UHT, pelo fato de serem termodúricos (ROBINSON, 1990). Dentre esses, *B. cereus* tem

importância na indústria de laticínios, pois quando se apresenta em contagens de cerca de 10^6 UFC/mL é capaz de produzir toxinas responsáveis por intoxicações alimentares. Além disto, esse microrganismo é capaz de produzir proteases e fosfolipases extracelulares, resultando na coagulação doce e no sabor amargo do leite pasteurizado (COLLINS, 1981). LARSEN e JORGENSEN (1997) examinaram cerca de 458 amostras de leite, coletadas em três indústrias diferentes, e observaram que 56% das amostras apresentavam *B. cereus*, devendo-se ressaltar que no verão esse valor atingia 72%, contra 28% no inverno. *B. cereus* psicrotófico foi detectado em 29 de 115 amostras de leite cru e em 120 de 257 amostras de leite pasteurizado, tendo as células viáveis sido encontradas dentro de uma variação de $1,0 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. GIFFEL et al. (1997) avaliaram a incidência de *B. cereus* em tanques de refrigeração de leite e observaram que 40% de 133 amostras estavam contaminadas.

Do ponto de vista do controle de qualidade do leite pasteurizado e dos produtos a ele relacionados, as bactérias psicrotólicas, particularmente as do grupo Gram-negativo, são as de maior importância. Essa importância tem sido acentuada em virtude do prolongamento do tempo de estocagem dos produtos, por força de inovações ou avanços tecnológicos de comercialização (CELESTINO et al., 1996).

Praticamente, todo leite pasteurizado e os produtos dele derivados, quando mantidos sob refrigeração, eventualmente, desenvolvem um ou mais defeitos, que são atribuídos às bactérias psicrotólicas, os quais estão relacionados com o sabor (rancidez, sabor de fruta, gosto amargo ou pútrido) e as alterações de cor (COLLINS, 1981). Alguns defeitos são facilmente detectáveis com população em torno de 10^7 UFC/mL; em certos casos, é necessária uma população dez vezes superior para o surgimento de tais defeitos, atribuindo-se essa variação às diferentes atividades bioquímicas dos psicrotóxicos (ROBINSON, 1990).

Os psicrotóxicos são alteradores por causa da produção de proteases e lipases termorresistentes. Dentre eles, incluem-se as espécies de *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* e *Streptococcus* (FRANK et al., 1992; MEER et al., 1993). As *Pseudomonas* são,

normalmente, as mais encontradas no leite cru (COUSIN, 1982). A maioria dessas bactérias, especialmente *P. fluorescens*, está associada à proteólise e, ou, à lipólise em leite e derivados (COUSIN, 1982).

Os psicrotróficos estão bastante distribuídos na natureza e são contaminantes comuns do leite. As formas usuais de contaminação incluem o solo, o ar, a água, a vegetação e as fezes (SHAH, 1994). Entretanto, a principal fonte de contaminação com bactérias psicrotróficas continua sendo os utensílios e equipamentos utilizados no manuseio do leite, nas fazendas e usinas de beneficiamento (COUSIN, 1982).

As alterações nas proteínas do leite, causadas por enzimas de bactérias psicrotróficas, são importantes quando relacionadas à manutenção da qualidade do leite e de seus derivados, estocados sob refrigeração. As proteases termoestáveis podem atuar sobre as proteínas do leite, causando o desenvolvimento de gosto amargo e a coagulação do leite. No leite, há diversas enzimas de origem microbiana que têm a capacidade de hidrolisar proteínas. Foi estimado que de 70 a 90% das amostras de leite cru contêm psicrotróficos capazes de produzir proteases termorresistentes (SHAH, 1994).

As proteases produzidas especialmente pelas *P. fluorescens* são termorresistentes o suficiente para resistirem a certos tratamentos térmicos (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Essas enzimas, dependendo de sua concentração inicial no leite e do tempo disponível para ação, degradam, com taxa variável, principalmente a k-caseína e, em ordem decrescente, a beta e a alfa-caseínas (COUSIN e MARTH, 1977; COUSIN, 1982).

As proteases produzidas por bactérias psicrotróficas podem causar alterações bioquímicas no leite durante o seu manuseio, antes e após a pasteurização (COUSIN, 1982; BIGALKE, 1983; JASPE et al. 1995). *Pseudomonas fluorescens* produz protease que requer cerca de 7 minutos, a 120 °C, para perder 90% de atividade (ADAMS et al., 1975).

As proteases termorresistentes produzidas por algumas espécies de *Pseudomonas* e de *Bacillus* podem alterar leites esterilizados (FRANK et al., 1992; BRASIL, 1993; COLLINS et al., 1993). Os esporos do gênero *Bacillus* são comumente encontrados em leite cru e podem sobreviver à pasteurização (FRANK et al., 1992).

Quando tratadas termicamente, as lipases naturais do leite são termolábeis e perdem 42 e 98% de suas atividades a 57,2 e 72,9 °C, por 10 segundos, respectivamente. Por outro lado, as lipases produzidas por *Pseudomonas* sp. resistem ao tratamento térmico de 110 °C, por 10 segundos (SENYK et al., 1982).

ANDERSON (1979) observou a termoestabilidade da lipase produzida por *P. fluorescens* e determinou os valores D (tempo necessário para redução de 90% da população) a 140 °C como sendo de 3,6 e 2,0 minutos, respectivamente, em caldo nutriente e em leite desnatado. Essa lipase é também extremamente resistente à inativação química, tendo sido apenas parcialmente inativada após 20 horas em solução de uréia 8 M, solução de hipoclorito de guanidina 6 M e dodecil sulfato de sódio a 1%.

Os alimentos mais freqüentemente envolvidos com problemas de lipólise são os cremes de leite, a manteiga e as margarinas (BRASIL, 1993).

Em relação às bactérias patogênicas que podem deteriorar o leite e seus derivados, incluem-se as consideradas emergentes, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* O157:H7 (DOYLE, 1992; SMITH e FRATAMICO, 1995; BUZBY et al., 1996).

Nos Estados Unidos, estima-se um gasto anual entre 5 e 9 bilhões de dólares com o tratamento médico-hospitalar de doenças de origem alimentar, considerando todas as formas de contaminação dos alimentos (SMITH e FRATAMICO, 1995; BUZBY et al., 1996). Sabe-se que em cerca de 25% dessas doenças estão envolvidos matéria-prima, equipamentos e utensílios contaminados, sujeitos, portanto, à formação de processos de adesão microbiana (TROLLER, 1993).

As superfícies de equipamentos ou utensílios que entram em contato com alimentos durante o processo de industrialização não devem contaminar ou aumentar a incidência de microrganismos, sejam alteradores ou patogênicos. No entanto, sabe-se que, sob determinadas condições, os microrganismos se depositam, aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular. A multiplicação resulta na formação de colônias, e quando a massa celular é suficientemente grande para agregar nutrientes,

resíduos e outros microrganismos, está formado o que se denomina de biofilme microbiano (SNYDER JR., 1992; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

2.2. Biofilmes microbianos

Muitas bactérias, no seu habitat natural, podem existir em duas formas diferentes: a) o estado planctônico, em que se apresentam de forma livre, e b) no estado sésil, em que estão aderidas a uma superfície (MARSHALL, 1992).

O biofilme consiste de microrganismos aderidos a uma superfície por substâncias poliméricas extracelulares (COSTERTON et al., 1987). Outra definição estabelece que o biofilme é a agregação de células microbianas, que crescem e multiplicam-se em uma superfície, sendo essa agregação promovida por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios microrganismos (FLINT et al., 1997).

Estima-se que 99% de todas as bactérias em ambiente natural estão em biofilmes ou, pelo menos, residem em sua superfície (DALTON e MARCH, 1998).

2.2.1. Teorias da formação do biofilme

Existem diversas teorias que tentam explicar a formação do biofilme. Uma delas evidencia que o processo ocorre em duas etapas. A primeira é reversível, estando o microrganismo fracamente aderido à superfície por atração eletrostática e pelas forças de Van der Waals. Nesse estágio, a célula bacteriana pode ser facilmente removida. A segunda etapa é irreversível, depende do tempo de aderência e envolve a adesão da célula à superfície por material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzido pelo microrganismo (MOSTELLER e BISHOP, 1993). Forma-se, então, uma estrutura denominada de matriz de glicocálix, que suporta a formação do biofilme. Essa matriz é produzida somente após a adesão superficial e fornece condições para a adesão do peptidoglicano das bactérias Gram-positivas e da

parte externa da membrana das Gram-negativas (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

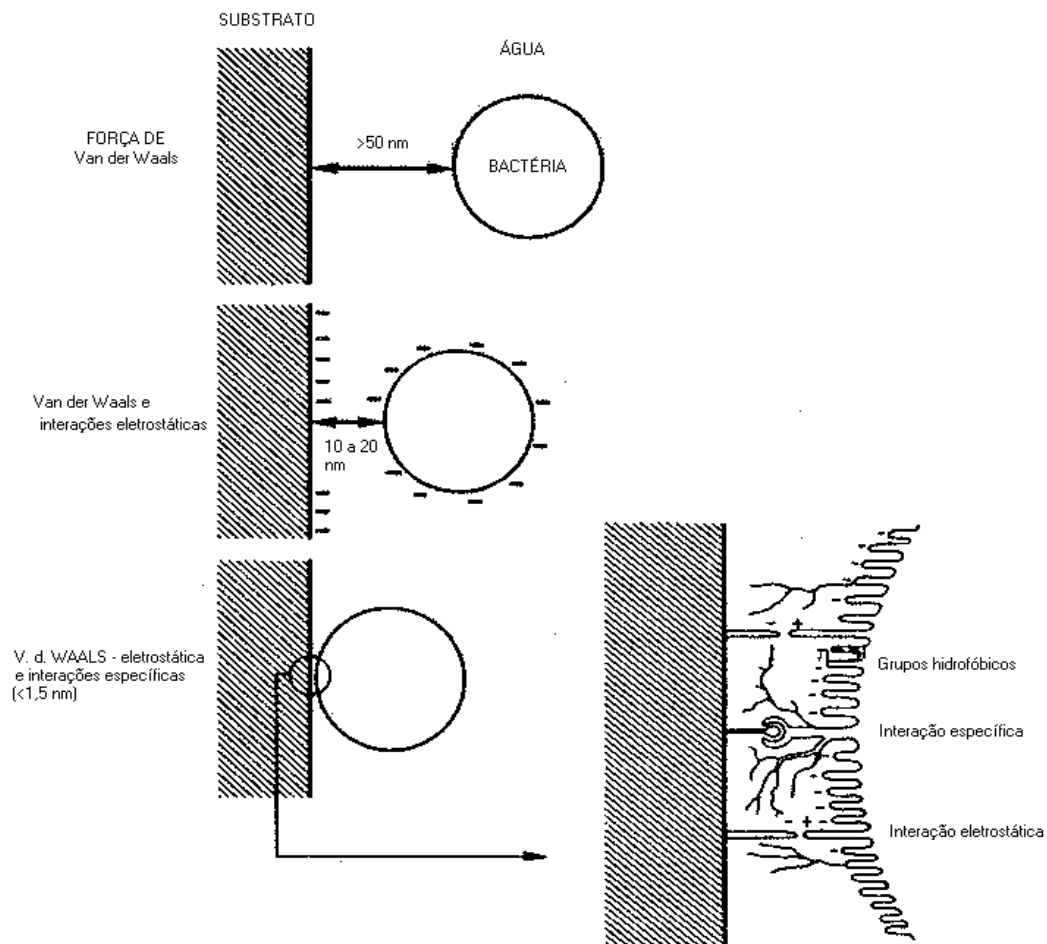
Uma segunda teoria propõe a formação do biofilme como um processo que ocorre em etapas (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). Assim, ocorre inicialmente o fluxo de nutrientes, matéria orgânica e inorgânica na superfície sólida, o que leva à formação de uma camada que contém nutrientes orgânicos e inorgânicos. Numa próxima etapa, acontecem a adesão dos microrganismos à superfície e o início do crescimento celular. Em seguida, há o aumento da atividade metabólica no biofilme e, finalmente, as células começam a ser liberadas do biofilme, podendo resultar em características indesejáveis à qualidade do alimento.

Segundo a teoria proposta por BUSCHER e WEERKAMP (1987), o mecanismo de adesão bacteriana segue os seguintes passos (Figura 1):

- A distâncias de separação maiores que 50 nm, somente as forças atrativas de Van der Waals atuam na adesão da bactéria ao substrato. Essa distância é relativamente grande para a oposição de forças e o reconhecimento de componentes específicos de superfície. A aproximação é mediada por propriedades não-específicas da superfície da célula.

- A uma distância entre 10 e 20 nm, ocorrem interações em virtude da repulsão eletrostática, força que se opõe às forças de Van der Waals. Neste estágio, é possível que a adesão seja reversível, porém se altera com o tempo para pouco reversível ou essencialmente irreversível, em razão do rearranjo da superfície da célula, o que leva a interações de curta distância. Para isto, o filme de água precisa ser removido da interface bactéria/superfície. O maior papel da hidrofobicidade e dos componentes de superfície hidrofóbica na adesão bacteriana, provavelmente, é em razão do efeito desidratante nesse filme de água, o que possibilita a ocorrência de interações específicas de curta distância.

- A uma distância menor que 1,5 nm, onde a barreira da energia potencial já foi superada, interações específicas, como as que podem se originar de forças polares de curta distância, podem ocorrer. Essas interações podem levar a uma ligação essencialmente irreversível.



Fonte: BUSSCHER (1984).

Figura 1 - Representação esquemática das interações envolvidas na adesão bacteriana a um substrato sólido.

A interação específica é uma interação microscópica, como a interação entre um componente da superfície da célula e o substrato, ocorre a uma distância extremamente curta e permite ligações específicas iônicas, pontes de hidrogênio e outras ligações químicas. A interação não-específica é definida como aquela que ocorre em virtude da propriedade de superfície microscópica total, como as cargas ou a energia livre de superfície. Essas interações podem atuar a consideráveis distâncias do substrato. Mais recentemente, foi proposto um valor calculado com base na força de Van der Waals, em que uma longa distância seria > 50 nm, enquanto a curta seria menor que 1,5 nm (BUSSCHER e WEERKAMP, 1987).

O contato direto entre bactéria e substrato pode ser estabelecido, em nível molecular, por substâncias poliméricas extracelulares (SPE) produzidas pelas bactérias. Essas substâncias não estão sujeitas ao mesmo tipo de repulsão que as bactérias, portanto podem facilitar a adesão entre a bactéria e a superfície por várias combinações de ligações químicas (eletrostática, covalente e de hidrogênio), interações dipolo (dipolo-dipolo, dipolo-induzido dipolo e íon-dipolo) e interações hidrofóbicas. Conseqüentemente, o mesmo tipo de bactéria pode ter diferentes níveis de adesividade (MARSHALL, 1992). As SPE produzidas pelos microrganismos desenvolvem um importante papel, protegendo a célula da desidratação, já que podem reter água em uma quantidade várias vezes maior que a sua massa e se desidratam lentamente. Em *P. aeruginosa*, a presença de ácido urônico acetilado no alginato bacteriano aumenta a capacidade de hidratação (COSTERTON et al., 1994).

A cápsula de muitas bactérias é composta por polissacarídeos, embora algumas espécies de *Bacillus* possam formar cápsula de polipeptídeo. A presença de cápsula pode aumentar a adesão microbiana e atuar como defesa contra a fagocitose. Esse material pode também facilitar a adsorção de agentes tóxicos, prevenindo, assim, a penetração no citoplasma bacteriano (BOWER, 1996).

Após o contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras se tornam mais grossas com o tempo, levando à formação da matriz do biofilme. Dentro da matriz, outras substâncias orgânicas e inorgânicas e material particulado podem existir juntamente com

microrganismos. A produção de exopolissacarídeo aumenta com a adesão da bactéria à superfície. Caso as células do biofilme sejam reinoculadas no meio, como células planctônicas, haverá redução na produção de exopolissacarídeos (KUMAR e ANAND, 1998).

Segundo COSTERTON et al. (1994), o glicocálix é um elemento integrante da membrana externa de bactérias Gram-negativas e do peptidoglicano de células gram-positivas. Ele é composto de diversas fibras de polissacarídeo ou proteínas globulares, e em seu estado hidratado contém cerca de 98 a 99% de água. *P. aeruginosa* forma alginato como maior constituinte do glicocálix.

2.2.2. Fatores que influenciam a adesão bacteriana

A temperatura e o pH também influenciam a adesão da bactéria. STONE e ZOTTOLA (1985) mostraram que na adesão em aço inoxidável, em fluxo contínuo de leite, *P. fragi* produz fimbria em 30 minutos, a 25° C, e em 2 horas, a 4° C. Em um estudo conduzido por HERALD e ZOTTOLA (1988), ficou evidenciado que *P. fragi* apresenta máxima adesão ao aço inoxidável, em pH na faixa de 7 a 8, o que coincide com o pH ótimo para o seu metabolismo. Presume-se que a adesão foi auxiliada pelo transporte ativo de cátions para a superfície, aumentando sua carga superficial.

Segundo ZOTTOLA e SASAHARA (1994), *Y. enterocolitica* adere melhor ao aço inoxidável a 21° C, do que a 35 ou 10° C. Observou-se que a 35° C as células não possuíam flagelo, o que evidencia que essa estrutura é necessária para que a adesão ocorra. Os autores concluíram também que *Y. enterocolitica* adere melhor em pH de 8 a 9,5 do que em pH 6, nas temperaturas de 10, 21 e 35° C. Em pH 6, poucos flagelos foram observados, o que pode ter tido influência na adesão (HERALD e ZOTTOLA, 1988).

ASSANTA et al. (1998) investigaram a adesão de *Aeromonas hydrophila* em sistema de distribuição de água. Este microrganismo aderiu facilmente em superfícies como aço inoxidável, cobre e polibutileno, após um tempo de exposição entre 1 e 4 horas, nas temperaturas de 4 e 20° C. O polibutileno, que tem uma baixa energia de superfície (42,2 mJ.m⁻²), foi mais colonizado do que o aço inoxidável (65,7 mJ.m⁻²). Poucas células foram observadas no cobre,

apesar de sua baixa energia de superfície ($45,8 \text{ mJ.m}^{-2}$). Os autores sugerem que tal fato pode ser atribuído a um efeito antimicrobiano do íon cobre, que interfere com a adesão e multiplicação bacteriana. MAFU et al. (1990) estudaram a adesão de *L. monocytogenes* em aço inoxidável, vidro, polipropileno e borracha. Os autores concluíram que a adesão ocorre em todos os tipos de superfície estudada, após um tempo de contato de 20 minutos, a 20° C , ou 1 hora, a 4° C .

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são forças físico-químicas envolvidas na aderência de microrganismos às superfícies sólidas. A hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do microrganismo. Acredita-se que interações hidrofóbicas apresentam papel relevante na adesão de microrganismos, tanto em superfícies inertes para processamento de alimentos, quanto em superfícies de alimentos, como a carne (DENYER et al. 1993).

Por outro lado, as bactérias Gram-negativas e gram-positivas apresentam carga elétrica negativa em pH neutro. Embora os mecanismos não sejam completamente entendidos, esses fatores físico-químicos têm um importante papel na aderência microbiana (HOOD e ZOTTOLA, 1995). Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, dependendo do modo de crescimento bacteriano e das condições de cultura. No fermentador contínuo, quando a taxa de crescimento da cultura aumenta, a hidrofobicidade diminui (KUMAR e ANAND, 1998).

Tanto a bactéria quanto o substrato adquirem cargas superficiais (geralmente negativa), como resultado da adsorção de íons ou de ionização de grupos de superfície. Essas cargas de superfície podem, então, atrair íons com carga contrária, que estão na fase aquosa circundante. Assim, quando a bactéria se aproxima da superfície do substrato, interações começam a se desenvolver, as quais são resultantes das cargas positivas e negativas que circundam as duas superfícies. A magnitude dessa força depende do potencial das duas superfícies, da força iônica e da constante dielétrica do meio circundante, além da distância entre a bactéria e o substrato (DENYER et al., 1993).

A carga elétrica da superfície e sua microtopografia são importantes. Por exemplo, as superfícies com elevada carga elétrica, como o vidro, suportam

melhor o processo de aderência do que as superfícies com menor carga, como o poliestireno (DENYER et al., 1993). Os microrganismos, assim como algumas superfícies biológicas nas quais eles se aderem, freqüentemente têm carga negativa sob condições fisiológicas. Essas cargas surgem principalmente de grupos fosfatos e carboxil, podendo ser uniformemente distribuídas com cargas positivas dos grupos aminos (BUSSCHER e WEERKAMP, 1987). Ainda segundo os autores, as espécies bacterianas com baixa energia livre de superfície se aderem irreversivelmente e em grandes números em substrato com a mesma característica.

O estudo da adesão das bactérias à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas das duas superfícies (bactéria e substrato) e da interação entre elas. Em geral, ambas as superfícies possuem uma carga global negativa, e para que ocorra a adesão é necessário que a barreira de repulsão eletrostática seja superada pela força atrativa (Quadro 1).

Quadro 1 - Forças envolvidas na adesão microbiana à superfície

Tipo de Interação	Forças de Interação	Características
Reversível	Van der Waals Eletrostática	Longo alcance, fraca especificidade
Irreversível	Dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo, iônica, pontes de hidrogênio, hidrofobicidade	Curto alcance, geralmente alta especificidade

Fonte: DENYER et al. (1993).

O eventual resultado da interação entre essas forças é governado por princípios termodinâmicos. O encurtamento da distância entre o substrato e a bactéria faz com que as forças adesivas comecem a predominar, o que é favorecido pela presença de apêndices e polímeros extracelulares (DENYER et al., 1993)

Segundo DENYER et al. (1993), a adesão reversível é resultante principalmente da interação de forças a longas distâncias, e a adesão irreversível é geralmente considerada como resultado de interações mais

definitivas. Essa última interação conta, normalmente, com o encurtamento da distância entre as forças físicas de atração sumarizadas no Quadro 1, que são otimizadas pela interação dos grupos componentes da célula-receptor de ligação.

A resistência aos antimicrobianos, por parte de bactéria em biofilmes, é aumentada quando comparada à das células planctônicas. Tal fato se deve à reduzida difusão dos antimicrobianos no biofilme e às alterações fisiológicas que ocorrem em virtude da redução da taxa de crescimento e produção de enzimas que degradam as substâncias antimicrobianas (KUMAR e ANAND, 1998).

2.2.3. Composição do biofilme

Uma quantidade relativa de componentes orgânicos e inorgânicos que fazem parte de biofilmes pode ser determinada por meio de combustão. Os sólidos voláteis e fixos refletem a fração orgânica e inorgânica, respectivamente. A fração volátil de uma população microbiana planctônica é maior que 90%. Para biofilmes, esse valor é consideravelmente menor, já que existe uma massa de constituintes inorgânicos aprisionada ou precipitada dentro da matriz do biofilme. Contudo, em experimentos laboratoriais, em que dominam os componentes bióticos, a fração volátil do biofilme pode chegar a 80% do peso seco do biofilme. A relação carbono/nitrogênio, em alguns biofilmes, é consideravelmente maior (cerca de cinco vezes) do que em células microbianas. Tal fato, provavelmente, é devido à grande proporção de polímeros extracelulares (DENYER et al., 1993).

A fração inorgânica é maior em biofilmes que estão em ecossistemas aquáticos naturais, onde argila, areia e sedimentos penetram na matriz, influenciando as propriedades físicas desses biofilmes (DENYER et al., 1993).

A presença do biofilme pode levar a condições favoráveis à corrosão do metal onde o biofilme está posicionado. Pode ocorrer corrosão localizada, pela aeração diferencial que as células sofrem em função da distribuição irregular no biofilme e pela formação de sítios de anaerobiose na base do biofilme, em razão de a respiração microbiana consumir o pouco oxigênio presente. Tal situação gera condições favoráveis para o crescimento de bactérias sulfato-

redutoras que usam o hidrogênio. Este elemento é gerado em meio ambiente anaeróbio, pela combinação de prótons e elétrons, que por sua vez aumentam a corrosão do metal. Os sulfato-redutores também produzem metabólitos corrosivos, como os sulfitos, que levam à incorporação de produtos de corrosão, como o sulfito de ferro dentro da matriz do biofilme (DENYER et al., 1993).

2.2.4. Matriz extracelular

Sabe-se que o conteúdo da matriz extracelular em substâncias poliméricas varia de 50 a 90%. A terminologia para o material extracelular associado com os agregados de células ou biofilmes varia na literatura, sendo referido como limosidade, cápsula, glicocálix e substância polimérica extracelular (DENYER et al., 1993)

A grande maioria das substâncias poliméricas extracelulares é polissacarídea. Os açúcares, como glicose, galactose, manose, frutose, ramnose, N-acetilglicosamina, ácido glucurônico, ácido galacturônico e ácido gulurônico, são típicos constituintes do polissacarídeo bacteriano (DENYER et al., 1993).

Estudos demonstraram que muitos polissacarídeos e fosfolipídios acumulam mais tarde na fase estacionária, quando a célula mostra um estresse fisiológico. Alguns investigadores têm observado a produção de diferentes polissacarídeos durante o crescimento exponencial, quando comparados com os produzidos na fase estacionária. DENYER et al. (1993) induziram uma condição de desnutrição em células que estavam em crescimento exponencial e observaram que foi liberado um polissacarídeo viscoso e solúvel, enquanto o mesmo polissacarídeo não foi produzido por células que estavam em fase estacionária. Tal fato evidencia que uma situação de desnutrição provoca a produção de diferentes polímeros.

Segundo DENYER et al. (1993), alguns pesquisadores observaram menor produção de polissacarídeos por bactérias desnutridas do que por culturas em crescimento. Quando o meio de crescimento é rico, a bactéria pode produzir grandes quantidades de polímeros, porém ela os libera como uma limosidade e não os utiliza na formação da cápsula. Ainda segundo os

autores, pesquisas demonstraram que anticorpos feitos contra polímeros produzidos em culturas líquidas reagiram com a matriz do biofilme “in situ”, o que indica que a substância polimérica extracelular do biofilme contém alguns polímeros semelhantes aos produzidos no líquido da cultura pelos organismos. Outro estudo mostrou que o mesmo microrganismo produz mais substâncias poliméricas extracelulares no biofilme do que em cultura em suspensão (DENYER et al., 1993).

As substâncias poliméricas extracelulares influenciam as propriedades físicas do biofilme, incluindo difusividade, condutividade térmica e propriedades reológicas. Por causa da densidade de cargas e do estado iônico encontrado no exopolissacarídeo, pode ocorrer a formação de uma barreira elétrica contra a difusão de diversas substâncias, havendo uma filtração de moléculas, o que impede a entrada de certas substâncias no biofilme. A natureza altamente hidratada e predominantemente polianiônica dos exopolissacarídeos também evidencia que eles podem atuar como uma matriz trocadora de íons, servindo para aumentar a concentração local de formas iônicas, como metais pesados, amônia, potássio, entre outros, que têm um efeito oposto aos grupos aniônicos. Tal comportamento pode não ter efeito sob nutrientes carregados, incluindo açúcares, contudo pode servir como armadilha para nutrientes catiônicos, como aminas, especialmente sob condições oligotróficas (COSTERTON et al., 1987). A penetração de moléculas carregadas como biocidas pode ser, em parte, restrita por esse fenômeno (COSTERTON e LAPPIN-SCOTT, 1989).

Alguns polímeros componentes do biofilme podem reduzir significativamente a suscetibilidade do organismo a uma série de antibióticos (COSTERTON e LAPPIN-SCOTT, 1989). Contudo, somente a adsorção ou a diminuição da difusão causada pelo exopolissacarídeo não podem, sozinhas, explicar a resistência da bactéria a antibióticos. Portanto, torna-se necessário realizar mais trabalhos, a fim de que se possa entender a diminuição na sensibilidade aos antibióticos pelas células em biofilmes.

2.2.5. Moléculas e apêndices celulares envolvidos na adesão

Os apêndices celulares, como fímbrias, pili e flagelos, ajudam na aderência da bactéria às superfícies, porque facilitam o contato entre superfícies e células (HOOD e ZOTTOLA, 1995).

Os apêndices de superfície podem servir de ponte entre a célula e o substrato de adesão, anulando a repulsão eletrostática. Esses apêndices podem variar em tamanho e rigidez, chegando a ter várias vezes o tamanho da célula. Muitos componentes de superfície da célula têm sido reconhecidos como sondas moleculares, atuando estereoquimicamente com moléculas de superfície oposta, e são chamadas de adesinas (BUSSCHER e WEERKAMP, 1987).

Os apêndices de superfície contribuem para a característica de superfície, assim como para a hidrofobicidade, a carga superficial e a energia livre de superfície, além do fato de que muitas substâncias podem estar transientemente associadas com a superfície da célula e afetar suas propriedades. Um bom exemplo é o composto anfifílico conhecido como ácido lipoteicóico, que é essencialmente um constituinte da membrana citoplasmática de muitas bactérias Gram-positivas, porém migra através da parede celular para o líquido do meio ambiente. Na superfície da célula, o ácido lipoteicóico pode atuar como uma molécula específica, por exemplo, ligando *Streptococcus pyogenes* às células epiteliais e, ao mesmo tempo, mediando a ligação na interface água/hidrocarbono (BUSSCHER e WEERKAMP, 1987).

Streptococcus expressam um conjunto de componentes de superfície importantes para a adesão. Há evidências de que a fase reversível da adesão envolve interações hidrofóbicas entre a célula hospedeira e o ácido lipoteicóico da parede celular bacteriana. Resultados adicionais indicaram que a proteína M (adesina) de *Streptococcus* é requerida para a adesão irreversível. Esse modelo é, provavelmente, análogo ao que acontece quando a bactéria coloniza superfícies inertes. Uma importante classe de adesinas inclui fatores que ligam especificamente aos componentes da matriz extracelular (DALTON e MARCH, 1998).

A fibronectina (Fn) é o maior componente da matriz extracelular. *Campylobacter jejuni* expressa uma proteína da membrana externa (37 kDa)

que se liga à Fn, o que facilita sua adesão a outros biofilmes (DALTON e MARCH, 1998). De acordo com os autores, *Staphylococcus aureus* expressa duas proteínas associadas com a parede celular que se ligam à Fn e são chamadas FnBPA e FnBPB. Os mutantes de *S. aureus* que não possuíam o gene *fnbA* ou *fnbB* foram efetivos em aderir a uma superfície, porém o duplo mutante para *fnbA* e *fnbB* foi completamente deficiente na adesão. Se um dos dois tipos de genes for fornecido pelos plasmídios, então a adesão é restaurada.

Os microrganismos mutantes podem ser importantes no estudo dos processos de formação de biofilmes. Os mutantes de *E. coli* que não produziam pili do tipo I ou eram imóveis não formaram biofilme em cloreto de polivinil (PVC) (STICKLER, 1999). Esse estudo mostrou, ainda, que os mutantes deficientes em flagelos ou que tinham o flagelo imobilizado foram bastante falhos na capacidade de formar biofilmes. Nos experimentos com PVC foram encontradas poucas células, em pequenos agrupamentos. Foi proposto que a mobilidade é importante para sobrepor a força de repulsão entre bactéria e substrato e que a pili do tipo I é necessária para estabilizar a adesão.

Experimentos com mutantes de *P. fluorescens* que apresentavam deficiência na capacidade de adesão em superfície mostraram que alguns desses mutantes eram imóveis, enquanto outros eram incapazes de produzir uma proteína chamada ClpP, que é geralmente encontrada na superfície da célula (O'TOOLE e KOLTER, 1998a). O crescimento em citrato, glutamato ou meio minimamente suplementado com ferro, embora não tenha restaurado a mobilidade, recuperou a capacidade da célula para iniciar a formação do biofilme. Fenômeno similar foi observado com mutantes *clpP*. Foi sugerido que *P. fluorescens* pode utilizar múltiplas estratégias para a iniciação da adesão e que essas estratégias são dependentes de sinais do meio ambiente.

Estudos com mutantes de *P. aeruginosa* que eram incapazes de formação de biofilme em PVC mostraram que essas estirpes apresentavam defeito na pili do tipo IV ou flagelo mediador da motilidade (O'TOOLE e KOLTER, 1998b). Estirpes selvagens desse microrganismo formaram uma monocamada de células em superfície, após 4 horas. Em 5 a 8 horas, as monocamadas tornaram-se confluentes, o que fez com que toda a superfície ficasse coberta. Os mutantes sem mobilidade não conseguiram aderir ao PVC em um período de 8 horas. Os mutantes com defeito na pili do tipo IV formaram

monocamadas dispersas. A retração e a extensão na pili do tipo IV são consideradas as causas da migração das células através da superfície. No caso de *P. aeruginosa*, parece que a mobilidade mediada pelo flagelo é importante para a adesão e formação de monocamadas dispersas de células.

Ao que parece, a pili de *Salmonella enteritidis* também está envolvida na iniciação de biofilme em aço inoxidável e teflon. Os mutantes sem capacidade de produzir uma fina fimbria agregativa, chamada SEF 17, foram incapazes de formar biofilmes espessos típicos de estirpes selvagens. Foi sugerido que essa fimbria atua de modo a estabilizar o contato célula-célula durante a formação do biofilme (AUSTIN et al., 1998).

Em bactérias Gram-negativas, a comunicação celular pode ser feita por meio de lactonas homoserina aciladas (AHLs) (FUQUA et al., 1996). Essas pequenas moléculas sinalizantes são excretadas por células e acumulam em culturas, como função da densidade celular. Assim, as AHLs podem interagir com os receptores na superfície da célula bacteriana que controlam a expressão de genes, o que pode resultar no controle de densidade local de células. Experimentos com mutantes de *P. aeruginosa* incapazes de produzir as AHLs mostraram que eles produzem uma fina camada de células na superfície do vidro. A adição de AHL ao meio permitiu a restauração da capacidade para produzir biofilmes semelhantes ao produzido pelo tipo selvagem. Foi também observado que os mutantes em biofilmes não desenvolviam resistência ao biocida dodecil sulfato de sódio, que era característica nas células do biofilme do tipo selvagem. Concluiu-se, então, que a acumulação de AHL, durante o desenvolvimento do biofilme, causa a transformação de células individuais planctônicas para o fenotipo da bactéria do biofilme e coordena sua conduta na construção de estruturas complexas de comunidades multicelulares.

O flagelo é formado por um complexo de proteínas. As subunidades de proteínas expostas no ponto de inserção do flagelo com a membrana plasmática e a porção filamentosa podem ser, idealmente, posicionadas para mediar a adesão às superfícies animadas e inanimadas (DALTON e MARCH, 1998). Os autores sugerem que as espécies marinhas de *Vibrio* utilizam o flagelo como um mecanossensor, durante a colonização da superfície, melhor do que as adesinas. Essa bactéria existe no meio marinho como bacilos

planctônicos de 2 µm de comprimento, contendo um único flagelo polar. A adesão em laboratório leva à conversão dessa célula a uma forma com mais de 30 µm de comprimento e muitos flagelos laterais. Essa alteração na morfologia da célula permite uma colonização eficiente da superfície. O flagelo polar obtém energia a partir do transporte de íon sódio, enquanto o flagelo lateral utiliza o transporte de prótons para geração de energia. A inibição da rotação do flagelo polar por agentes que bloqueiam os canais de sódio resulta na produção de flagelo lateral. Tal fato evidencia que, quando as células com flagelo polar se aproximam da superfície, a rotação desse flagelo pode ser negativamente afetada. A diminuição da rotação (ou fluxo do íon sódio) fornece um sinal para a produção do flagelo lateral. Assim, o flagelo polar atua como mecanossensor (DALTON e MARCH, 1998).

A fímbria ou pili é uma estrutura filamentosa composta de subunidades de proteína encontrada em uma variedade de superfícies de células (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, dentre outras). O papel da fímbria na adesão de células patogênicas tem sido bastante estudado. A interação bactéria-hospedeiro é dependente de uma proteína existente no corpo ou na ponta da fímbria. Esta liga a receptores específicos no hospedeiro e ativa os genes hospedeiro-célula com a transdução da sinalização, levando ao aumento da adesão ou invasão (DALTON e MARCH, 1998).

2.2.6. Locais onde o biofilme pode se formar

Segundo KUMAR e ANAND (1998), o biofilme pode ser desenvolvido em praticamente todo tipo de superfície e em qualquer meio ambiente no qual os microrganismos viáveis estão presentes. Para isto, deve ser estabelecido o que se chama condicionamento da superfície. Assim, substâncias orgânicas e inorgânicas provenientes do alimento podem formar um filme condicionante na parede do equipamento. Essas moléculas e os microrganismos são transportados para a superfície por difusão ou, em alguns casos, por fluxo turbulento do líquido. A acumulação de moléculas na interface sólido-líquido (filme condicionante) leva a uma alta concentração de nutrientes, quando comparada à fase fluída, o que resulta na formação do biofilme, que também depende da associação competitiva de culturas no meio. É evidente que o

microrganismo sempre adere a uma superfície condicionante. Portanto, a microtopografia da superfície de contato com o alimento é igualmente importante, já que essa superfície pode conter canais e fissuras onde a bactéria pode se fixar.

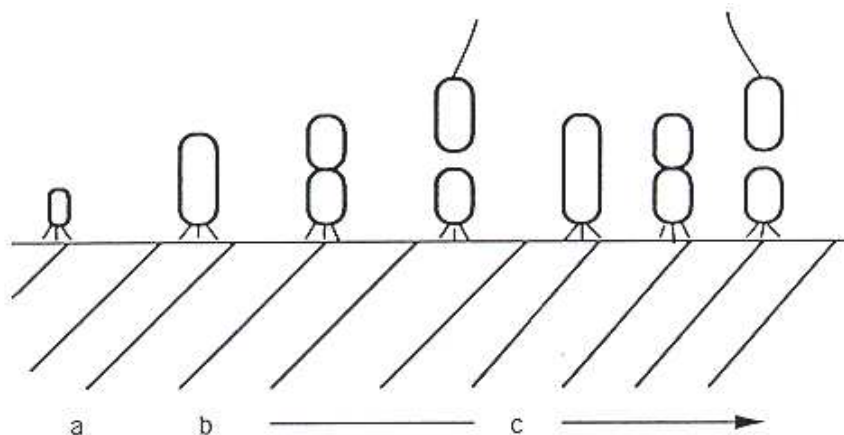
Dessa maneira, os microrganismos podem aderir ao aço inoxidável, ao alumínio, ao vidro, à borracha, ao teflon, ao náilon, à fórmica, ao polipropileno e ao ferro forjado (SCHWACH e ZOTTOLA, 1984; SUÁREZ E FERREIRÓS, 1991; SASAHARA e ZOTTOLA, 1993; JEONG e FRANK, 1994; RESTAINO et al., 1994; KUMAR e ANAND, 1998).

2.2.7. Ecologia dos biofilmes

Os microrganismos não estão uniformemente distribuídos dentro de um biofilme. Eles crescem na matriz, intercalados dentro de canais permeáveis. A estrutura dos biofilmes pode ser harmônica, em virtude de a colonização de diferentes microrganismos possuir variados requerimentos nutricionais, o que evita a competição entre eles (KUMAR e ANAND, 1998).

AUSTIN e BERGERSON (1995) registraram a capacidade de a bactéria aderir à superfície de borracha e aço inoxidável. Os fatores que afetam a adesão incluem a fase de crescimento da bactéria, a viabilidade, o tempo que a bactéria está em contato com a superfície, a temperatura do meio de suspensão, a rugosidade da superfície, a taxa de fluxo e as propriedades da superfície da célula, como hidrofobicidade e carga de superfície (HUP et al., 1979; BOUMAN et al., 1982).

Não foi esclarecido ainda como os componentes macromoleculares da parede da bactéria interagem com os componentes do filme de nutrientes, estabelecido na superfície do substrato onde ocorrerá a adesão (MARSHALL, 1992). Estudos mostraram que células pequenas de *Vibrio DW1*, em estado de desnutrição, quando aderidas, passam a metabolizar moléculas orgânicas (por exemplo, ácidos graxos e proteínas), iniciando o crescimento e atingindo o tamanho normal (Figura 2), quando então começam a se reproduzir. Essas células se aderem em uma posição perpendicular em relação ao substrato. A célula-mãe permanece aderida, enquanto a célula-filha é liberada, tornando-se planctônica (MARSHALL, 1992).



Fonte: MARSHALL (1992).

Figura 2 - Adesão e reprodução de *Vibrio marinho* DW1: a) adesão de pequena célula em estado de desnutrição; b) crescimento celular na superfície do substrato; e c) repetidos ciclos de reprodução celular.

Outras bactérias se aderem de forma a se posicionarem no mesmo plano da superfície e, então, se dividem, formando diversas colônias, ou as células originadas dessas colônias podem ser lentamente liberadas para o meio. Supõem-se que algumas bactérias sejam liberadas para o meio, em razão das alterações da superfície da célula ou das propriedades do substrato (MARSHALL, 1992).

A natureza oligotrófica de alguns ecossistemas implica um fluxo de nutrientes insuficientes para manter a atividade microbiana. Quando a densidade populacional é baixa, a competição entre bactérias por espaço, oxigênio e outros fatores limitantes é somente moderada. No meio oligotrófico muitas bactérias crescem ativamente, enquanto outras são incapazes de localizar nutrientes suficientes para manter o crescimento e, portanto, se mantêm num estado de desnutrição que é freqüentemente acompanhado por uma redução do tamanho e da respiração da célula, além de aumentar a hidrofobicidade da superfície, o que causa um incremento na adesividade da bactéria (DEAGOSTINO et al., 1991).

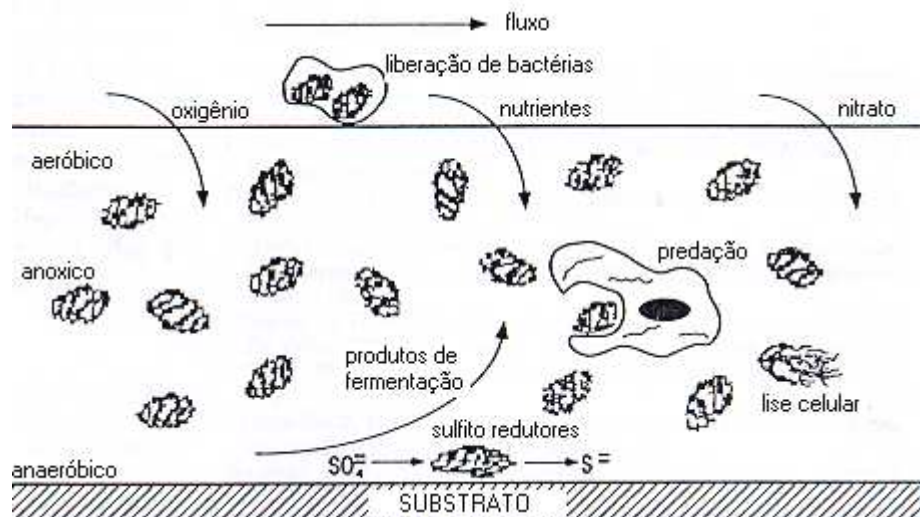
A estrutura comunitária do biofilme pode variar com a localização, a natureza dos organismos constituintes e a disponibilidade de nutrientes. Assim, eles podem variar de camadas grossas a finas. Biofilmes de *P. aeruginosa*,

cujo fluxo de nutrientes foi constante, colonizaram a superfície de maneira a obter uma forma semelhante a cogumelos (COSTERTON et al., 1995). Uma questão importante é como as células de *P. aeruginosa* se comunicam e coordenam sua sobrevivência na construção do biofilme.

A formação do biofilme é limitada pela disponibilidade e pelo transporte de nutrientes, a partir da fase aquosa. O oxigênio, normalmente, não é um fator limitante. As multicamadas de bactérias tornam-se embebidas em uma matriz polimérica, o que dificulta a difusão de nutrientes. Logo se estabelece um gradiente de oxigênio, como resultado da sua rápida utilização por bactérias aeróbias e da baixa taxa de difusão de oxigênio através da matriz do biofilme (Figura 3). As bactérias aeróbias localizadas na zona superior do biofilme têm o acesso máximo aos nutrientes, e à medida que a profundidade aumenta criam-se níveis diferentes de concentração de nutrientes dentro do biofilme (MARSZALEK et al., 1979).

Segundo MARSHALL (1992), alguns biofilmes, contudo, parecem ter canais na matriz polimérica que permitem uma limitada difusão de nutrientes para os seus níveis mais baixos. A dificuldade de difusão do oxigênio para camadas mais profundas do biofilme leva à formação de uma zona de anaerobiose, na qual a atividade respiratória é mantida por bactérias capazes de utilizar nitrato ou compostos orgânicos como alternativa aos receptores de elétrons. Em condições anaeróbias, prevalecem as bactérias fermentativas. Essas bactérias formam ácidos graxos e orgânicos de baixo peso molecular, assim como dióxido de carbono e hidrogênio, produtos que ajudam no crescimento de bactérias sulfato-redutoras e bactérias metanogênicas. Alguns produtos da fermentação se difundem para outras zonas dentro do biofilme e são metabolizados por bactérias aeróbias. Dentro do biofilme, as bactérias estão sujeitas ao ataque de amebas e outros protozoários e metazoários, além do parasitismo por bacteriófagos.

Outro fator extrínseco que determina a taxa de desenvolvimento do biofilme e a estrutura comunitária é o estado trófico da fase aquosa. Os nutrientes orgânicos e inorgânicos levam a água a determinar o número, o tipo e o estado metabólico da bactéria planctônica, assim como a capacidade de adesão. Algumas bactérias aderem mais eficientemente quando desnutridas, enquanto outras o fazem sob boas condições nutricionais (MARSHALL, 1992).



Fonte: MARSHALL (1992).

Figura 3 - Biofilme mostrando a entrada de nutrientes, oxigênio e nitrato da fase aquosa; as zonas aeróbia e anaeróbia; a presença de predadores, como ameba; os subprodutos da fermentação; e a atividade de bactérias sulfito-redutoras (SRB).

O fluxo existente dentro de uma tubulação por onde passa o alimento desenvolve um papel importante no controle de nutrientes para o biofilme. A taxa de fluxo pode também determinar os tipos de bactérias que colonizam a superfície. Sob fluxo turbulento, as bactérias capazes de adesão rápida podem ter vantagem. Outro grande fator que determina a mistura de bactérias no biofilme é a superfície. Neste sentido, a rugosidade, a carga e a superfície de energia livre podem influenciar (MARSHALL, 1992).

A interação de várias populações microbianas durante os estádios iniciais de formação do biofilme tem um importante efeito na estrutura e fisiologia do biofilme. Em comunidades naturais, as interações microbianas observadas são complexas. A espécie colonizadora inicial pode favorecer a colonização por espécies que são fisiologicamente compatíveis, enquanto inibe a adesão de outras. A média de espessura de biofilmes formados com *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* em monoespécies foi de 15 e 30 μm , respectivamente, enquanto no biofilme, em ambas as espécies, foi de 40 μm (KUMAR e ANAND, 1998).

As substâncias poliméricas extracelulares ajudam na colonização por outras espécies. Presume-se que, em um biofilme com mistura de espécies, a substância polimérica extracelular produzida pode aumentar a estabilidade de outras espécies dentro do biofilme e, ou, estabilizar interações que podem ocorrer entre polímeros de diferentes espécies (KUMAR e ANAND, 1998).

O crescimento e a reprodução de uma bactéria colonizadora primária pode modificar a característica de superfície do substrato, tornando-o suscetível a uma subsequente colonização por organismos secundários. O biofilme desenvolvido incorpora não somente os microrganismos de colonização secundária, como também o material inanimado, incluindo colóides e minerais, assim como detritos orgânicos (DENYER et al. 1993).

HERALD e ZOTTOLA (1988) estudaram a adesão de *L. monocytogenes* e observaram que esse microrganismo se adere em aço inoxidável, produzindo o que parece ser uma grande quantidade de exopolissacarídeo.

SASAHARA e ZOTTOLA (1993) estudaram a adesão e a formação de biofilme em vidro e aço inoxidável por *P. fragi* e *L. monocytogenes*. Os resultados indicaram que, quando essas bactérias crescem juntas, elas formam um biofilme maior e mais complexo do que se o crescimento fosse individual. *P. fragi* é o microrganismo predominante e o colonizador primário. A matriz estabelecida por *Pseudomonas* parece envolver as células de *Listeria* no biofilme.

Após o crescimento, o biofilme passa por uma fase de liberação de células, que é definida como uma transferência de biomassa a partir deste para a fase líquida, que ocorre de duas formas (DENYER et al., 1993): 1) erosão, que é a contínua remoção de pequenas partículas a partir do biofilme e 2) a liberação esporádica de fragmentos maiores do biofilme. Os fatores ambientais podem influenciar a taxa de erosão, portanto o cálcio livre na água diminui a taxa de erosão em biofilme de *P. aeruginosa*. A liberação de fragmentos maiores é freqüentemente notada quando o substrato está altamente carregado e o fluxo é laminar (DENYER et al. 1993).

A espessura do biofilme pode ser influenciada pela densidade de espécies. Assim, alguns estudos demonstraram que, em cultura pura, *P. aeruginosa* forma um biofilme que raramente excede 50 µm de espessura,

enquanto em cultura mista o biofilme pode ser mais espesso que 120 μm . No entanto, os estudos descritos por DENYER et al. (1993) mostraram uma espessura maior que 300 μm em biofilmes formados por *P. aeruginosa*, em cultura pura. A condutividade térmica de um biofilme em cultura mista é similar à da água, portanto, conclui-se que o biofilme fornece cerca de 27 vezes mais resistência à transferência de calor do que o aço inoxidável de igual espessura. Desta maneira, um biofilme bastante fino pode restringir significativamente a transferência de calor através de um tubo de aço inoxidável (DENYER et al., 1993).

MARSHAL (1992) observou que mutantes de bactérias de origem marinha apresentam alguns genes que não são expressos em meio líquido ou em ágar, mas são ativados em superfície sólida. É provável que a ativação ou desativação desses genes dependa da condição físico-química da interface sólido-líquida. A disponibilidade de mutantes que expressem certos genes somente na superfície sólida fornece oportunidade para estudar os genes envolvidos, sua fisiologia e o mecanismo físico-químico específico envolvido na sua expressão.

2.2.8. Dinâmica do biofilme

A dinâmica biológica, química e física do desenvolvimento do biofilme segue, normalmente, uma seqüência temporal ordenada. O desenvolvimento do biofilme envolve a fase de adesão, crescimento, produção de polissacarídeo e maturação, usualmente seguida de liberação de parte do biofilme da superfície (DENYER et al., 1993).

Sabe-se que certas proteínas desenvolvem um importante papel na adesão microbiana. Alguns estudos mostraram que proteínas como albuminas, gelatina, fibrinogênio e pepsina inibem a adesão de *Pseudomonas* ao poliestireno. Outros estudos mostraram que a caseína favorece o processo de adesão. A albumina demonstrou ser pouco favorável à adesão de *L. monocytogenes* em sílica (KUMAR e ANAND, 1998).

DENYER et al. (1993) sugeriram que, na maioria dos casos, a bactéria aderida evidencia o aumento na atividade metabólica, porém somente quando

em baixa concentração de nutrientes. Ainda segundo os autores, os estudos têm demonstrado que o crescimento de *E. coli* melhorou depois da sua adesão em superfície, porém somente quando a concentração de glicose foi menor que 25 mg/L. A adesão na superfície pode oferecer vantagem à célula para efetuar a captura e, ou, entrada de nutrientes escassos no meio (DENYER et al., 1993). Os autores relataram que diversos trabalhos confirmaram um aumento na atividade metabólica para bactérias associadas com a superfície em baixa concentração de nutrientes, ou até mesmo ausência de nutrientes. Esses resultados indicam que, em presença de nutrientes, as células planctônicas foram mais ativas do que as aderidas, enquanto na falta de nutrientes as células sésseis metabolizaram reservas endógenas, sendo mais ativas.

2.2.9. Adesão de esporo bacteriano

A estrutura do esporo é mais complexa que a das células vegetativas. A camada mais externa do esporo é o exosporo. Em seguida, está a capa do esporo, que é composta de uma camada ou de camadas de proteínas. Abaixo da capa está o córtex, formado de peptidoglicano. Dentro do córtex estão a camada originadora da parede celular, a membrana externa e o core, que originam uma nova célula vegetativa (BROCK et al., 1994). MORAES et al. (1997) verificaram a eficiência dos sanificantes hipoclorito de sódio e ácido peracético em uma suspensão de esporos isolados de abatedouros avícolas. Os resultados mostraram que os sanificantes, em contato de 30 minutos, diminuíram a população de esporos isolados mais resistentes em apenas 90%, aproximadamente, o que demonstra sua resistência a agentes químicos.

Segundo ANDERSON et al. (1995), os esporos de *B. cereus* são muito adesivos em diferentes superfícies. Essa forte adesão é devido a três características: à alta hidrofobicidade, à baixa carga de superfície e à morfologia do esporo, já que esses são cobertos com longos apêndices, que promovem a adesão.

Clostridium bifermentans possui um tipo de apêndice que se projeta para fora, a partir de um único ponto no esporo. O corte transversal desse apêndice revela que eles são constituídos de três camadas concêntricas de

subunidades de pequena densidade eletrônica, o que pode ter influência na adesão bacteriana (SAMSONOFF et al., 1970).

Segundo DESROSIER et al. (1981), alguns esporos bacterianos apresentam apêndices chamados pili. Essa estrutura, geralmente, é composta de monômeros de uma única proteína chamada pilina, que quando reunida dá a forma de estrutura tubular com 3 a 25 nm de espessura e 0,2 a 20 µm de comprimento. Estudos mostram que os esporos de, pelo menos, 16 estirpes de *B. cereus* possuem pili. Esses esporos apresentam em média oito pili que se encontram distribuídas aleatoriamente no esporo e auxiliam na adesão do esporo.

O motivo pelo qual o esporo bacteriano apresenta uma forte hidrofobicidade ainda não é bem entendido. Sabe-se que a adesão desses esporos à linha de processamento e aos equipamentos da indústria representa problemas para obtenção de alimentos com qualidade (RONNER et al., 1990). Esses autores realizaram estudos com cinco esporos bacterianos diferentes (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*), com a finalidade de analisar o grau de hidrofobicidade. O resultado mostrou que *B. cereus* foi o mais hidrofóbico, com cerca de 45% de adesão, enquanto *B. licheniformis* e *B. polymyxa* apresentaram entre 10 e 20% de adesão. Já *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* não passaram de 5%. O trabalho também mostrou que, em geral, os esporos apresentam maior capacidade de adesão tanto em superfícies hidrofóbicas quanto hidrofílicas quando comparados com suas células vegetativas. Dos esporos analisados, *B. cereus* é o único que não apresenta exosporo. Sua estrutura externa é composta principalmente de proteínas (52%), lipídios (13%) e fosfolipídios (6%). Segundo os autores, essa estrutura pode contribuir para uma alta hidrofobicidade e um alto grau de adesão. Também, a pili pode estar envolvida na sobreposição da força de repulsão eletrostática.

2.3. Biofilmes em indústrias de leite

Na indústria de leite, os biofilmes podem ser divididos em duas categorias: 1) biofilmes formados em superfície trocadora de calor, em contato direto com o produto; e 2) biofilmes formados em meio ambiente de processamento em geral (FLINT et al., 1997).

Diversos trabalhos têm estudado a formação de biofilmes como consequência do meio ambiente de processamento do alimento (CARPENTIER e CERF, 1993; NOTERMANS, 1994; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Os biofilmes de indústrias de produtos lácteos têm algumas características que os distinguem dos biofilmes associados a outros alimentos. Nesses biofilmes, freqüentemente, uma única espécie microbiana predomina. Tal comportamento pode ser consequência do tratamento térmico do leite por ocasião da pasteurização, o que reduz a competição das espécies Gram-negativas sensíveis ao aquecimento e permite que espécies termodúricas sejam freqüentemente encontradas no leite, como é o caso do *S. thermophilus*. Os biofilmes são também caracterizados por terem rápido desenvolvimento, com números maiores que 10^6 bactérias/cm², na seção de regeneração do pasteurizador, após de 12 horas de operação (BOUMAN et al., 1982).

O tipo de bactéria contaminante do leite pasteurizado pode ser reflexo do crescimento de biofilmes. Por exemplo, um grande número de espécies de *Bacillus* e *Streptococcus* termodúricos no leite pasteurizado, comparado com o leite cru, pode ser explicado por contaminação a partir da liberação de células de biofilmes (FLINT et al., 1997).

Os estudos sobre as características de células que formam biofilmes na superfície de equipamentos da indústria láctea fornecem informação para melhorar o entendimento de como esses biofilmes se desenvolvem. Todos os *Streptococcus* termofílicos isolados de pasteurizadores foram encontrados como sendo hidrofóbicos e com carga negativa (FLINT et al., 1997).

2.4. Importância dos biofilmes na indústria láctea

Os biofilmes são de interesse na indústria, pois as bactérias que chegam a formar esses biofilmes são mais difíceis de ser eliminadas do que as células planctônicas. Além disto, uma vez estabelecido, o biofilme pode atuar como fonte de contaminação para produtos e outras superfícies.

A contaminação microbiana é a maior causa da baixa qualidade dos produtos lácteos. A contaminação atribuída ao desenvolvimento de biofilme tem sido observada na fabricação de queijo, soro, leite em pó e outros derivados do leite (HUP et al., 1979). Um resumo da microbiota predominante em biofilmes de diferentes produtos lácteos pode ser observado no Quadro 2.

Quadro 2 - Microrganismos envolvidos na formação de biofilmes, em diferentes processos adotados no processamento de leite

Microrganismos	Superfície de Processamento
<i>Acinetobacter spp.</i>	Linhas de transferência de leite
<i>Bacillus spp.</i>	Membranas de ultrafiltração e evaporadores
<i>Escherichia coli</i>	Membranas de ultrafiltração
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Membranas de ultrafiltração
Bactéria termofílica não-esporogênica	Evaporadores de soro e leite - seção de pré-aquecimento
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Pasteurizador do leite Tanques de manufatura de queijo

Fonte: FLINT et al. (1997).

O desenvolvimento de biofilmes, que consistem de *Streptococcus* termorresistentes, tem causado contaminação de queijo, em pasteurizadores, o que resulta em problemas de qualidade nesse produto. Na linha de processamento de leite, o número de *Streptococcus* termorresistentes chega a atingir mais de 10^6 UFC/mL, depois de 7 a 8 horas de operação. O queijo Gouda produzido a partir desse leite fica com uma textura inadequada (HUP et

al., 1979). A adesão de bactérias e proteínas no pasteurizador foi observada em uma temperatura que varia de 30-50 °C (HUP et al., 1979). As bactérias associadas com a seção de resfriamento do pasteurizador estavam aderidas diretamente ao aço inoxidável, em nível de 10^7 UFC/cm² (BOUMAN et al., 1982).

FLINT et al. (1997) encontraram biofilme, consistindo de *B. subtilis*, no tubo de aço inoxidável da membrana de ultrafiltração em indústria de processamento de soro. O aumento do biofilme, eventualmente, bloqueia os poros na membrana do sistema de ultrafiltração.

O crescimento do *B. stearothermophilus* na superfície de equipamentos de leite em pó foi descrito por FLINT et al. (1997). Parece que muitos dos problemas de contaminação do leite em pó com bactéria termofílica resulta do desenvolvimento de biofilme na superfície de aço inoxidável do atomizador.

O desenvolvimento de biofilmes em pasteurizadores de leite foi reportado por CRIADO et al. (1994). A microbiota predominante na linha de manuseio do leite cru é de bactérias psicrotóficas Gram-negativas, embora os gêneros predominantes sejam de bactérias Gram-positivas (LEWIS e GILMOUR, 1987). As bactérias Gram-negativas contaminam a linha de processamento por meio da água, por exemplo, aderem-se às superfícies e podem ser fonte de contaminação para o produto final (CRIADO et al., 1994).

2.5. Inativação de microrganismos aderidos

Os microrganismos aderidos apresentam maior resistência à ação dos sanificantes (FRANK e KOFI, 1990; MOSTELLER e BISHOP, 1993). Na maioria das vezes, os sanificantes de uso rotineiro na indústria de alimentos, como os compostos à base de cloro, iodo, quaternários de amônia, peróxido de hidrogênio, clorohexidina, ácido peracético, dentre outros, são aprovados pelos testes laboratoriais, nas condições recomendadas pelos fabricantes. Tais testes, nos quais se incluem o teste de suspensão e a diluição de uso, utilizam suspensões microbianas produzidas em laboratórios. Sabe-se que em meios de cultivos, sejam sólidos ou líquidos, não há formação do glicocálix, fundamental ao processo de adesão. Geralmente, os sanificantes resultam em

cinco reduções decimais (RD) do número de células, após 30 segundos de contato, a 20° C, com suspensões de *S.aureus* e *E. coli* (CREMIEUX e FLEURETTE, 1991).

Por outro lado, as pesquisas revelam que os microrganismos em biofilmes foram entre 150 e 3.000 vezes e entre 2 e 100 vezes mais resistentes à ação do ácido hipocloroso e de monocloramínicos, respectivamente, do que os microrganismos não-aderidos (LE CHEVALIER et al., 1988). Da mesma forma, as células de *L. monocytogenes* aderidas foram resistentes ao cloreto de benzalcônio e a um sanificante ácido/aniônico por 10 a 20 minutos, enquanto as células não-aderidas foram eliminadas em 30 segundos de exposição aos sanificantes (FRANK e KOFI, 1990). A eficiência de iodóforo e hipoclorito de sódio sobre *P. fluorescens* e *Y. enterocolitica* foi igual ou acima de 5 RD no teste de suspensão. No entanto, essas bactérias aderidas em borracha e teflon apresentaram maior resistência (MOSTELER e BISHOP, 1993). Em superfície de teflon, a eficiência dos sanificantes foi de 3,09 e 3,19 RD, respectivamente, quando o microrganismo foi *Y. enterocolitica*, enquanto a população de *P. fuorescens* foi reduzida em 3,16 RD, quando aderida em superfície de borracha e teflon e exposta ao hipoclorito de sódio.

Os testes de suspensão e da diluição de uso são fáceis de executar e importantes para fins de registro dos sanificantes junto aos órgãos responsáveis pela liberação comercial desses agentes microbicidas (CZECHOWSKI, 1990; CREMIEUX e FLEURETTE, 1991). No entanto, esses testes não avaliam corretamente a ação desses agentes sobre os microrganismos aderidos em superfícies, formando os biofilmes.

Por outro lado, os métodos usuais para detecção da contaminação de superfícies envolvem a recuperação de células, como métodos que utilizam “swabs” ou placa de contato direto, rinsagem ou combinações destes (CREMIEUX e FLEURETTE, 1991; BLOMFIELD et al., 1994), porém a recuperação não é total (ZOLTAL et al., 1981). Sem dúvida, a produção de substâncias aderentes às superfícies por um grande número de microrganismos contribui para essa recuperação ineficiente. Atualmente, vários métodos têm sido usados para avaliar o processo de adesão. Dentre eles, incluem-se as microscopias eletrônica de varredura e de transmissão, as

microscopias de epifluorescência e de contraste de fase e os métodos não-visuais, como a medida de impedância e de bioluminescência (ZOTTOLA, 1997).

No controle e na prevenção de biofilmes microbianos, a etapa de remoção de resíduos é fundamental (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). Um biofilme microbiano presente numa superfície com resíduos oriundos do alimento impede uma efetiva penetração do sanificante para eliminar os microrganismos. O sanificante reage, inicialmente, com resíduos de proteínas, gordura carboidratos e minerais. No final, pouca atividade sanificante resta para agir sobre os microrganismos no biofilme. Sabe-se que, quando o biofilme é tratado corretamente com detergentes antes do uso dos sanificantes, os microrganismos são geralmente eliminados. No entanto, procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam os microrganismos aderidos (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Processos Fermentativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Fatores avaliados na adesão bacteriana em aço inoxidável

- 3.1.1. Espécie bacteriana com maior capacidade de adesão.
- 3.1.2. Efeito da temperatura de refrigeração.
- 3.1.3. Efeito da velocidade de circulação do leite.
- 3.1.4. Efeito do tempo de incubação.
- 3.1.5. Efeito da concentração de bactérias no leite.

3.2. Microrganismos e meio de cultura

Os microrganismos utilizados foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus cereus* NCTC11145 do tipo diarréico e *Enterococcus faecium*, pertencentes ao banco de cultura do Laboratório de Microbiologia e Processos Fermentativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. Esses microrganismos foram escolhidos em virtude do *P. aeruginosa* ser um Gram-negativo comum em leite cru, ou que tenha sofrido contaminação pós-processamento. *B. cereus* causa problemas em leite e derivados, entre os

quais citam-se a coagulação doce em leite UHT e o sabor amargo em creme de leite. Já *E. faecium* é uma bactéria láctica que pode causar acidificação do leite.

Os meios de cultivo utilizados foram o caldo Lactobacilli MRS (DE MAN et al., 1960), para *B. cereus* e *E. faecium*, e o caldo nutriente para *P. aeruginosa*. Após o cultivo por 12 horas, a 35° C, houve repicagem para o mesmo meio e nova incubação nas mesmas condições. Em seguida, foi feita a centrifugação a 9.800 g, em centrífuga J2-MC ("Beckman Instruments Inc.", Palo Alto, Calif.). As células foram ressuspensas em 100 mL do mesmo meio anteriormente descrito para cada microrganismo, contendo 10% de glicerol, distribuídas em tubos "Eppendorf" e armazenadas sob congelamento a -10° C.

3.3. Ativação dos microrganismos

Os microrganismos foram ativados em 10 mL de meio de cultura (MRS para *E. faecium* e *B. cereus* e caldo nutriente para *P. aeruginosa*), tendo sido, em seguida, incubados a 35° C, durante 12 horas para *E. faecium* e *P. aeruginosa* e 36 horas para *B. cereus*. Após esse período, houve uma repicagem para os mesmos meios, com reincubação a 35° C, durante 10 horas para *E. faecium* e *P. aeruginosa* e 36 horas para *B. cereus*.

3.4. Processo de adesão

Após a ativação, foi feita a inoculação de 400 mL de leite esterilizado (121° C/15 minutos) utilizando-se *P. aeruginosa* em todos os experimentos, com exceção do subitem 3.1.1., no qual foram incluídos *B. cereus* e *E. faecium*. A inoculação foi realizada de modo a obter uma contagem aproximada de 1×10^6 UFC/mL, para realizar os experimento citados no item 2.1., com exceção do subitem 3.1.5., no qual foram utilizadas, também, as concentrações de 10^4 UFC/mL e 10^5 UFC/mL. Foi realizado o plaqueamento do leite pela técnica em profundidade, utilizando-se ágar para contagem-padrão (PCA), com o objetivo de verificar o número de bactérias no leite. No caso específico do *B. cereus*, além do plaqueamento para contagem de células totais, foi feita também a contagem de esporos. Para isto, o leite inoculado foi aquecido em banho-maria

a 80° C/15 minutos, com o objetivo de inativar as células vegetativas. Em seguida, amostras do leite em diluições adequadas foram plaqueadas, conforme já descrito.

Para verificar a capacidade que as três culturas bacterianas apresentam para aderir em superfície, foi utilizado um modelo de circuito de processamento de leite (Figura 4) em aço inoxidável, constituído por uma tubulação de três quartos de polegada de diâmetro interno e comprimento total de 5,8 m, por onde circulou o leite a partir de um tanque de 25 L, que foi utilizado como reservatório. Em pontos específicos da tubulação, foram instalados cupons de prova em aço inoxidável, com formatos de cotovelo 90°, “T” e cilíndricos. As áreas superficiais internas dos cupons de prova foram: 108,06 cm² para cupons tipo “T”, 52,74 cm² para cupons em cotovelo 90° e 84,69 cm² para cupons cilíndricos

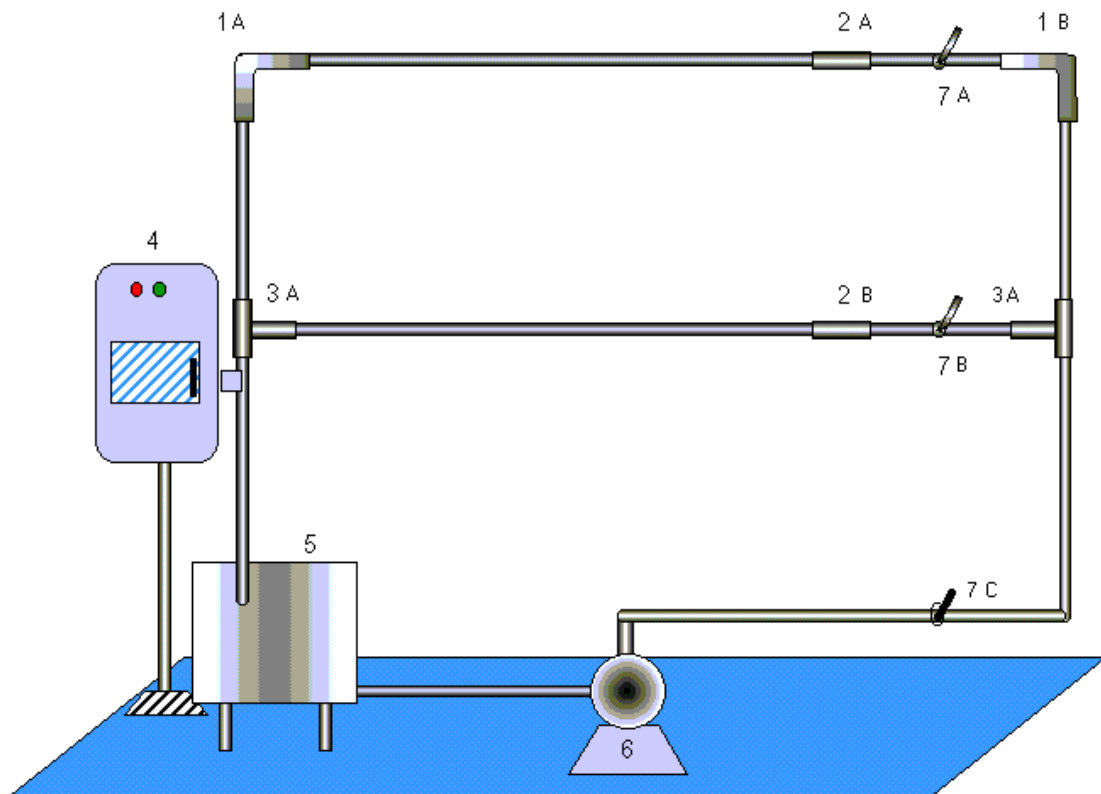


Figura 4 - Equipamento-modelo de linha de processamento de leite. 1) cupom de prova tipo cotovelo 90°, 2) cupom de prova cilíndrico, 3) cupom de prova “T”, 4) controle de potência, 5) tanque cilíndrico, 6) bomba centrífuga e 7) válvulas tipo gaveta.

Para permitir a adesão, o leite inoculado foi utilizado para encher os cupons de prova de aço inoxidável (27 mL de leite no cupom em cotovelo 90°, 57 mL no cupom em “T” e 49 mL no cupom cilíndrico), os quais foram incubados a 18° C em todos os experimentos, à exceção do subitem 3.1.2., no qual foram também utilizadas as temperaturas de 5 e 10° C. O tempo de incubação foi de 12, 24 e 48 horas para o experimento do subitem 3.1.4. e de 12 horas, para os demais experimentos. Após esse período, amostras do leite do interior dos cupons foram plaqueadas, como descrito anteriormente, e o restante foi descartado. Leite esterilizado foi adicionado aos cupons de prova, mantido ali por 2 minutos e depois novamente descartado, para eliminação de células planctônicas e, ou, esporos aderidos reversivelmente. Os cupons de prova 1A, 2A e 3A foram preenchidos com solução de citrato de sódio a 2% (20 mL no cupom em curva, 30 mL no cupom cilíndrico e 40 mL no cupom tipo “T”), rinsados sob agitação manual por 15 minutos e, em seguida, foi feito o plaqueamento da solução de rinsagem, com o objetivo de conhecer o número de bactérias aderidas aos cupons de prova antes da circulação do leite. Feito isto, a solução de citrato de sódio foi descartada e os três cupons foram tratados com uma solução de hipoclorito de sódio, contendo 300 mg/L de cloro residual livre, com pH 10 por 5 minutos, tendo, em seguida, sido lavados por três vezes em água destilada, para serem subsequenteiramente usados no equipamento. Os seis cupons de prova foram conectados ao equipamento-modelo da linha de processamento de leite. Ao reservatório do equipamento, foram adicionados 10 L de leite esterilizado (121°C por 15 minutos), que circulou por 10 minutos a 1 m/s, tendo no subitem 3.1.3. sido utilizadas também as velocidades de 0,5 e 1,5 m/s, em temperatura média de 15° C. Para manter a velocidade desejada, manuseou-se a válvula 7C de modo a obter uma vazão duas vezes maior que a desejada; a válvula 7A ficou totalmente aberta e a 7B foi aberta até o ponto em que permitia a distribuição da água em quantidade igual entre as válvulas 7B e 7A.

Para determinar a vazão em que as velocidades de 0,5, 1,0 e 1,5 m/s eram atingidas, foi realizado o seguinte cálculo:

$$X = \frac{Y(\text{m/s})}{TM (R)^2}$$

em que

Y = corresponde à velocidade que se deseja obter; e

R = corresponde ao raio da tubulação.

A fim de conhecer o número de bactérias removidas após a circulação do leite no modelo decorrido, o período de circulação do leite, os cupons de prova 1B, 2B e 3B, não-rinsados anteriormente, foram retirados do sistema, rinsados com solução de citrato de sódio, de maneira semelhante à anterior, e as soluções de rinsagem foram plaqueadas após diluições adequadas.

Os plaqueamentos foram feitos em duplicata, utilizando PCA, e a incubação foi a 35° C, por 48 horas. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Quando necessário, foi calculado o número de Reynolds, utilizando-se fórmula

$$Re = \frac{\rho V d}{\mu}$$

em que

ρ = massa específica do fluido (kg/m³);

V = velocidade de escoamento (m/s);

d = diâmetro da tubulação (m); e

μ = viscosidade do fluido (kg/m.s).

3.5. Higienização do modelo

Após a utilização, o modelo foi novamente montado, recolocando-se os cupons em seus devidos lugares, e em seguida submetido à higienização, utilizando a vazão de 1,5 m/s, que constou das seguintes etapas:

a) pré-enxágüe, com água à temperatura ambiente por 5 minutos;

b) limpeza com hidróxido de sódio, a 1% de alcalinidade cáustica, a 80° C, por 20 minutos;

c) enxágüe até remoção do hidróxido de sódio, o que foi constatado por meio de reação com fenolftaleína;

d) lavagem ácida com solução de ácido nítrico a 0,5%, a 70° C, durante 10 minutos;

e) enxágüe até remoção do ácido nítrico, constatada pela reação com alaranjado de metila;

f) sanificação com solução de hipoclorito de sódio a 100 mg/L de cloro residual livre, em pH 10, à temperatura na faixa de 20 a 25° C;

g) enxágüe até remoção do hipoclorito, constatada por reação com solução de ortotoluidina;

h) os cupons de prova, após cada experimento, foram lavados com detergente enzimático “Tergazyme” e escovados internamente;

i) a cada três procedimentos de adesão, utilizando o mesmo microrganismo, o modelo foi desmontado e as partes foram esterilizadas a 121° C/15 minutos; e

J) antes de cada uso, os cupons de prova foram esterilizados a 121° C/ 15 minutos.

3.6. Delineamento experimental

O experimento do subitem 3.1.1. foi conduzido segundo o delineamento em parcelas subdivididas, tendo nas parcelas quatro bactérias (tratamentos principais) e nas subparcelas, três tipos de cupons de prova (tratamentos secundários), tendo sido realizado em três repetições. Os demais subitens foram analisados por estatística descritiva.

A análise estatística foi feita mediante o uso do número de reduções decimais, ocorrido na população de microrganismos antes da circulação do leite (RD_A) e após a circulação do leite no sistema modelo (RD_B).

Para determinação da RD_A , foi feito o seguinte cálculo:

$$RD_A = \log N_0 - \log N_1$$

em que

N_0 = número total de bactérias (planctônicas e sésseis) dentro do cupom, após 12 horas de incubação; e

N_1 = número de bactérias sésseis dentro do cupom, após 12 horas de incubação.

Para achar o número de bactérias planctônicas (P_1), foi feito o plaqueamento de uma alíquota de 1 mL de leite do interior dos cupons de prova. O resultado obtido foi multiplicado pela quantidade total de leite contido dentro do cupom de onde a alíquota foi retirada.

O número de células sésseis (N_1) foi obtido com a rinsagem dos cupons 1A, 2A e 3A, pelo plaqueamento de uma alíquota de 1 ml de solução de citrato de sódio utilizada para fazer a rinsagem dos cupons de prova. O valor obtido foi multiplicado pela quantidade total de solução de rinsagem utilizada no cupom. Para obter N_2 , a rinsagem foi realizada nos cupons 1B, 2B e 3B, depois da circulação do leite na velocidade desejada. Portanto, pela soma de P_1 e N_1 , obteve-se N_0 .

Para determinação da RD_B , foi feito o seguinte cálculo:

$$RD_B = \log N_1 - \log N_2$$

em que N_2 = número de bactérias que permaneceram aderidas ao cupom, após a circulação do leite.

Portanto, considera-se que a adesão será maior para a bactéria que apresentar a menor redução decimal.

Para as comparações de interesse, foi realizado o teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da espécie bacteriana na adesão em aço inoxidável

Os resultados mostram que, entre as bactérias avaliadas, *E. faecium* foi a que apresentou a maior capacidade de multiplicação a 18° C em leite (Quadro 3). Observa-se que esse microrganismo obteve um aumento de cerca de dois ciclos logarítmicos, em 12 horas. Já *P. aeruginosa* apresentou um aumento de 0,9 ciclo logarítmico, enquanto *B. cereus* (esporos e células vegetativas) teve um aumento de 0,4 ciclo logarítmico.

Quadro 3 - Número médio de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no leite, imediatamente após a inoculação e com 12 horas de incubação a 18° C. Média de três repetições

Tempo	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i> (esporos + vegetativas)	<i>Bacillus cereus</i> (esporos)
	----- UFC/mL -----			
Inicial	2,4 x 10 ⁶	9,3 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶	7,8 x 10 ²
12 horas	2,1 x 10 ⁸	7,3 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ³

Pelos resultados, observa-se que, se houver abuso de temperatura (18° C) durante a estocagem do leite, *E. faecium* é o microrganismo que apresentará maior multiplicação, quando comparado aos demais. Segundo ANDRADE et al. (1998), *E. faecium* apresenta uma velocidade específica de crescimento (μ), em caldo MRS a 30° C, de 1,68 h⁻¹. Essa velocidade específica de crescimento pode ser considerada bastante elevada, se comparada com a de *Lactobacillus acidophilus*, que também é uma bactéria láctica e possui valor de $\mu = 0,921 \text{ h}^{-1}$ em MRS (FIGUEIREDO, 1997). Deve-se considerar que, em caso de abuso na temperatura por período prolongado, os microrganismos que têm alta velocidade específica de crescimento apresentarão maior multiplicação celular, o que pode resultar em grande número de células aderidas aos equipamentos.

Observa-se um pequeno aumento na população de esporos de *B. cereus*, passando de $7,8 \times 10^2$ UFC/mL no momento da inoculação para $1,4 \times 10^3$ UFC/mL, com 12 horas. É possível que tal resultado se deva basicamente a dois fatores, sendo o primeiro relacionado à mudança de meio de crescimento, já que esse microrganismo encontrava-se em meio MRS e foi transferido para o leite, e o segundo relacionado à alteração da temperatura de incubação, que anteriormente era de 35° C e passou para 18° C. Esses fatores podem ter induzido o microrganismo a entrar em fase lag de crescimento, havendo, portanto, pequena alteração no número de esporos e células vegetativas.

Com relação à adesão com 12 horas, observa-se, pelos resultados da análise de variância (Quadro 4), que existe diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao tipo de bactéria.

A maior adesão ocorreu para esporos de *B. cereus*, que apresentou menor redução decimal (Quadro 5), de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Esses esporos podem aderir na superfície de equipamentos e resistir ao processo de higienização, vindo, posteriormente, a germinar e a comprometer a qualidade do leite. Por isto, é importante que o leite seja processado o mais rápido possível, a fim de impedir que ocorra esporulação durante a estocagem antes do tratamento térmico, o que poderia comprometer a eficiência deste tratamento. A seguir, estão classificados, em ordem

Quadro 4 - Resumo da análise de variância do número de reduções decimais de diferentes microrganismos, em diferentes cupons de prova, antes da circulação do leite no modelo (RD_A)

FV	GL	SQ	QM	F	F _{5%}
Inóculo	3	12,66700	4,222333	118,9*	4,07
Resíduo	8	0,2840970	0,3551213E-01		

* Significativo a 5% de significância, pelo teste F.

Quadro 5 - Reduções decimais na população dos diversos microrganismos na superfície dos cupons de prova com 12 horas (RD_A) de incubação a 18° C. Média de três repetições

Microrganismos	RD _A
<i>Bacillus cereus</i> (esporos)	0,6179 ^A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2181 ^B
<i>Bacillus cereus</i> (esporos e vegetativas)	1,6831 ^C
<i>Enterococcus faecium</i>	2,2293 ^D

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5%.

crescente de redução decimal, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, incluindo esporos mais células vegetativas e *E. faecium*.

Na Figura 5, observa-se a classificação dos microrganismos quanto à porcentagem de adesão. Constata-se a seguinte ordem decrescente de capacidade de adesão: esporos de *B. cereus* (24,6%), *P. aeruginosa* (5,83%), *B. cereus*, nas formas vegetativa e esporulada (2,21%), e *E. faecium* (0,57%).

É interessante notar o alto percentual de adesão obtido com os esporos, que alcançaram 24,6%, cerca de 11 vezes maior que a adesão de células vegetativas e esporos (2,21%). De acordo com RONNER et al. (1990), alguns esporos são fortemente hidrofóbicos, o que facilita sua adesão às superfícies. Em um estudo que envolveu cinco espécies de bactérias que esporulam, foi observado que o esporo de *B. cereus* foi o que apresentou a maior capacidade

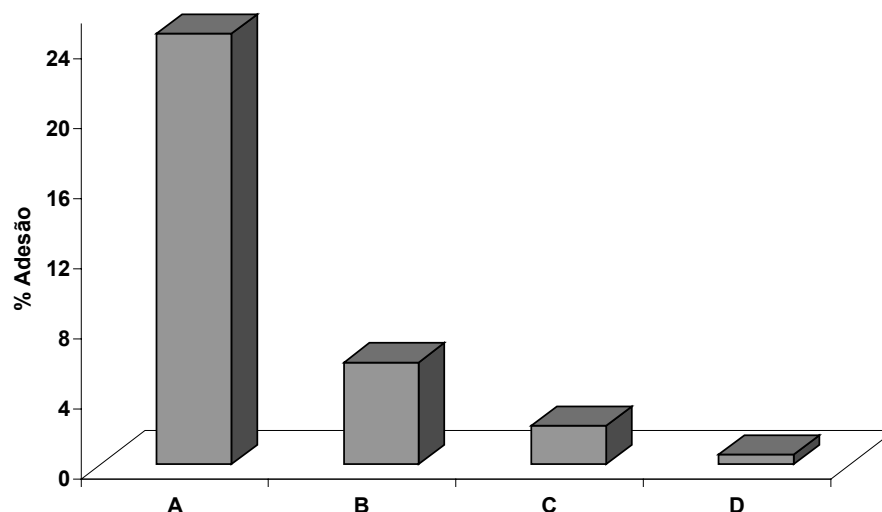


Figura 5 - Porcentagem de adesão média de bactérias, antes da circulação do leite no modelo, calculada em relação ao número total de bactérias dentro dos cupons com 12 horas, em aço inoxidável, a 18° C, A) esporos de *B. cereus*, B) *Pseudomonas aeruginosa*, C) *Bacillus cereus*, incluindo esporos mais células vegetativas e D) *Enterococcus faecium* (D).

de adesão, cerca de 45%, em superfície hidrofóbica, enquanto *B. licheniformis* teve melhor adesão em superfície hidrofílica. O estudo também demonstrou que a capacidade de adesão da forma esporulada é bem superior à forma vegetativa do mesmo microrganismo. Por exemplo, a adesão de *B. cereus* em superfície de vidro hidrofóbico é 100 vezes maior que a de células vegetativas (RONNER et al., 1990).

A adesão inicial para esporos encontrada nesta pesquisa, utilizando equipamento de aço inoxidável, está abaixo dos 45% descritos anteriormente no trabalho de RONNER et al. (1990); porém, deve-se considerar que esses últimos autores trabalharam com uma coluna preparada para atingir um grau de hidrofobicidade bem maior do que aquele encontrado em superfícies de aço inoxidável, comumente usadas em indústrias de processamento de leite. Ainda assim, os resultados demonstram certa coerência, pois este trabalho confirma a observação de que há maior tendência à adesão por parte dos esporos, quando comparados com suas células vegetativas. A maior adesão, aliada ao fato de que os esporos são mais resistentes ao calor, pode resultar em

problemas em linhas de circulação de leite, já que pode haver passagem de esporos pelo pasteurizador e, conseqüentemente, adesão aos equipamentos. Com o passar do tempo, esses esporos podem germinar e dar origem a um biofilme, que poderá servir como fonte constante de contaminação do produto após o processamento térmico. Pesquisadores encontraram no leite pasteurizado e estocado a 4,5° C, por 30 dias, uma predominância do gênero *Bacillus*, que representou cerca de 84% da população total (MICOLAJCIK e SIMON, 1978). Jay, citado por RONNER et al. (1990), afirmou que os esporos bacterianos viáveis, quando aderidos aos equipamentos de processamento, são considerados como o maior problema na indústria de alimentos; portanto, há a necessidade de desenvolver equipamentos que dificultem a adesão desses esporos.

Há grandes diferenças na capacidade de adesão de diferentes esporos, o que pode ser devido às suas características químicas e morfológicas. Os esporos de *B. cereus* possuem apêndices na sua superfície, e essas estruturas podem ajudar a sobrepor as forças de repulsão eletrostática entre o esporo e a superfície (RONNER et al., 1990).

Os tanques de recepção, geralmente, são usados para manter o leite por até um dia sob refrigeração, antes do processamento. Problemas no sistema de refrigeração desses tanques podem levar à perda de controle da temperatura, o que resultará em maior crescimento de microrganismos, além de possibilitar sua esporulação. Tal fato pode permitir maior adesão de bactérias às paredes dos tanques, o que dificultará sua higienização. Os microrganismos termodúricos aeróbios que participam da microbiota exterior do úbere e das tetas são representados em grande parte por esporos de *Bacillus* spp., apresentando contagens que variam de 10^2 a 10^5 UFC/teta (MARTIN, 1981). Os latões para o transporte de leite geralmente constituem fonte de esporo de *B. cereus* (ROBINSON, 1990), daí a necessidade de desenvolver técnicas que evitem a adesão desses esporos em equipamentos ou que diminuam a contaminação do leite.

Observou-se que *P. aeruginosa* apresentou a maior capacidade de adesão, em porcentagem, entre as formas vegetativas avaliadas. Este resultado está de acordo com o encontrado por SUÁREZ e FERREIRÓS

(1991), que, trabalhando com diversas espécies de microrganismos psicrotórficos isolados do leite, observaram que as espécies Gram-negativas possuem maior capacidade de adesão em superfícies de aço inoxidável, borracha e vidro do que as Gram-positivas. No entanto, os autores não explicam o motivo dessa maior adesão por parte das Gram-negativas. PALMER (1998) também observou que bacilos Gram-negativos predominam em tanques de refrigeração, sendo os equipamentos uma das principais fontes de contaminação do leite.

Outra informação importante é o número de células aderidas, ou seja, células sésseis na superfície que, neste caso, alcançaram os seguintes valores: $1,9 \times 10^2$ UFC/cm² para esporos de *B. cereus*; $3,9 \times 10^4$ UFC/cm² para *B. cereus* nas formas mais esporulada; $2,4 \times 10^5$ UFC/cm² para *P. aeruginosa*; e $6,5 \times 10^5$ UFC/cm² para *E. faecium*.

ANDRADE et al. (1998) encontraram uma adesão entre 10^5 e 10^6 UFC/cm², após 10 horas, para *E. faecium*, utilizando cupons de aço vegetativa inoxidável e caldo MRS. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Deve-se considerar que, apesar de *E. faecium* apresentar a menor capacidade de adesão, há um grande número de células aderidas ($6,5 \times 10^5$ UFC/cm²), em função de sua grande população no leite, com 12 horas ($2,1 \times 10^8$ UFC/mL), o que pode comprometer a qualidade do leite, principalmente por acidificação. Das alterações causadas no leite, a acidificação é a mais comum, resultante da fermentação da lactose por diferentes tipos de microrganismos (FRAZIER, 1988), particularmente em países de clima tropical.

É preocupante também o problema da higiene de linhas e equipamentos por onde passa o alimento já processado. Os biofilmes formados nesses pontos podem causar contaminação (LIMA, 1988).

A análise de variância (Quadro 5) feita para os resultados obtidos após a circulação do leite no circuito de processamento de leite mostrou que não há diferenças significativas ($P \geq 0,05$), quando diferentes tipos de bactérias são comparados. Porém, existe diferença em relação à remoção das células nos diferentes tipos de cupons.

Quadro 5 - Resumo da análise de variância do número de reduções decimais na população de diferentes microrganismos, em diferentes cupons de prova, após o uso do modelo de circulação do leite, com velocidade de 1 m/s por 10 minutos a 15° C

FV	GL	SQ	QM	F	F_{5%}
Bactéria	3	0,7837613	0,2612537	2,2119 ^{ns}	4,07
Resíduo (A)	8	0,9448708	0,1181088		
Cupom	2	0,4470955	0,2235478	6,30*	3,63
Cupom x Inóculo	6	0,4788803	0,07981338	2,25 ^{ns}	2,74
Resíduo (B)	16	0,5674057	0,03546286		
Total	35	3,222013			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

^{ns} Não-significativo a 5% de significância pelo teste F.

O teste de Tukey (Quadro 6) mostrou que a maior taxa de remoção de bactérias ocorreu no cupom tipo "T", enquanto a menor foi verificada no cupom cilíndrico. Além disto, não foi observada diferença significativa ($P \geq 0,05$) na remoção de bactérias para os cupons cilíndrico e cotovelo.

Quadro 6 - Médias de reduções decimais na população de microrganismos para os diferentes cupons de prova, após uso do modelo de circulação do leite a 1m/s por 10 minutos, a 15° C

Tipo de Cupom	RD_B
"T"	1,5496 ^A
Cotovelo	1,4713 ^{AB}
Cilíndrico	1,2840 ^B

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5%.

A interação microrganismos *versus* cupom não foi significativa (Quadro 5). Esse tipo de interação verifica se existe a possibilidade de uma determinada bactéria permanecer aderida, em maior porcentagem, em um determinado tipo de cupom, ao mesmo tempo em que uma outra espécie avaliada apresenta maior porcentagem de adesão em um segundo tipo de cupom.

Observou-se que 5,36% das células de *P. aeruginosa* permaneceram aderidas, após a circulação do leite no modelo de circuito (Figura 6). Este percentual, calculado com base no número de células aderidas antes da circulação do leite no circuito, representa $1,7 \times 10^4$ UFC/cm² de superfície. Esse número de microrganismos ainda é elevado o suficiente para causar problemas de deterioração do leite, uma vez que as lipases produzidas por *Pseudomonas* sp. são extremamente resistentes a um tratamento térmico a 110° C/10 minutos (ROBINSON, 1990).

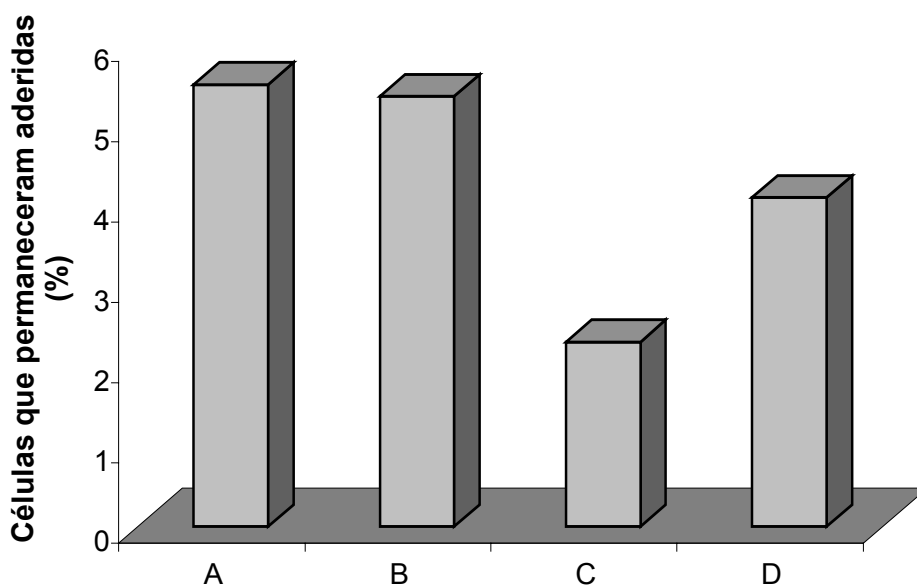


Figura 6 - Porcentagem de células que permaneceram aderidas aos cupons de aço inoxidável, independente do tipo de cupom, obtida para: A) *Enterococcus faecium*, B) *Pseudomonas aeruginosa*, C) esporos e células vegetativas de *Bacillus cereus* e D) esporos de *B. cereus*, em circuito de linha de processamento de leite a um fluxo de leite de 1 m/s por 10 minutos, a 15° C.

Observou-se, também, pelos resultados obtidos, que de cada 200 células de *E. faecium*, aproximadamente, uma (0,57%) está aderida e que de cada 100 células aderidas cerca de cinco (5,51%) não são removidas pelo leite. Foram enumeradas, antes da circulação do leite, $6,5 \times 10^5$ UFC/cm² para *E. faecium*, tendo esse número sido reduzido para $3,3 \times 10^4$ UFC/cm², após a circulação.

Deve-se preocupar principalmente com as bactérias que se fixam na superfície do equipamento e resistem ao fluxo do alimento, pois são elas que irão apresentar maior resistência à remoção durante a higienização do equipamento. Essas bactérias podem produzir substâncias poliméricas extracelulares que ajudam a consolidar sua adesão, tornando-se mais resistentes aos agentes sanificantes.

Após um período de processamento de 6 a 8 horas, pode haver um número significativo de bactérias aderidas aos equipamentos. As células que iniciaram o processo de adesão logo no início do período de trabalho podem apresentar maior resistência ao processo de higienização.

Outra questão a ser considerada é a liberação de células viáveis para o alimento, a partir das células aderidas. Neste sentido, a preocupação maior deve ser com microrganismos que, além de serem psicotróficos, tenham um curto tempo de geração mesmo aderidos, pois eles terão maior capacidade para crescerem no produto.

Observou-se uma adesão de esporos e células vegetativas de *B. cereus* antes da circulação do leite de 2,21%, devendo-se ressaltar que, das células aderidas, 2,3% resistiram ao fluxo do leite. Deve-se, no entanto, estar atento a alimentos que possuam alta contagem de esporos de *B. cereus*, já que estes apresentam alta capacidade de adesão (24,6%), ainda que somente 4,1% dos esporos aderidos resistam ao fluxo do leite. É possível que tal resultado se deva ao fato de os esporos não terem a capacidade para produzir substâncias poliméricas que venham a facilitar sua adesão aos cupons. Como consequência, eles permanecem aderidos apenas por forças como atração eletrostática, o que faz com que sua contagem após a circulação do leite seja bem inferior à inicial.

Podem ser observadas diferentes porcentagens de adesão obtidas para os variados tipos de cupons (Figura 7). Enquanto no cupom tipo "T" somente 3,0% das bactérias resistiram ao fluxo do leite, no cupom cilíndrico 6,0% das bactérias permaneceram aderidas. Para o cupom em cotovelo, a adesão foi de 3,6%, o que não representa diferença significativa ($p \geq 0,05$), quando comparado com os demais cupons. Constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os cupons tipo "T" e cilíndrico (Quadro 5). Segundo MELLO

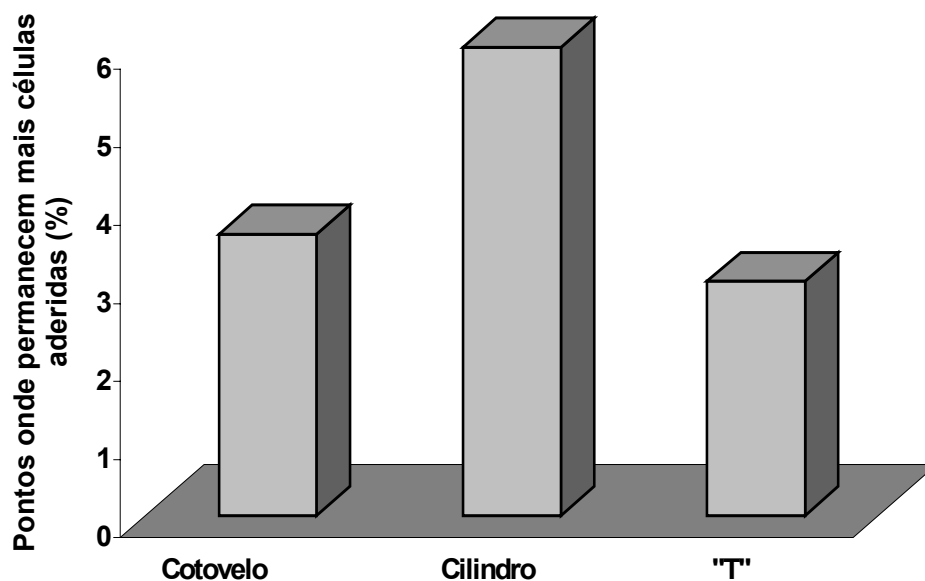


Figura 7 - Porcentagem de células que permanecem aderidas, independente do tipo de bactéria, obtida para diferentes tipos de cupons após a circulação do leite a 1m/s durante 10 minutos, a 15° C.

(1997), a turbulência em tubos cilíndricos é menor que a de tubos com formatos contornados, como em cotovelo e tipo "T". Por esta razão, o cisalhamento pelo fluido sobre as paredes dos cupons de prova cilíndrico é menor, podendo causar menor remoção de microrganismos.

4.2. Efeito da temperatura de refrigeração

Observa-se, no Quadro 7, que as incubações a 5 e 10° C não proporcionaram alteração considerável do número de bactérias, decorrido o período de 12 horas de incubação. Já a 18° C, o crescimento foi de 0,9 ciclo logarítmico, como constatado no item anterior.

É possível que fatores como a mudança de temperatura de incubação e de meio de cultura tenha provocado um aumento da fase lag da bactéria. Já a 18° C, como a diferença de temperatura foi menor, houve maior multiplicação celular.

Sabe-se que os tanques de refrigeração são, normalmente, mantidos em temperaturas na faixa de 5 a 7° C, o que reduz bastante a velocidade de

Quadro 7 - Contagem bacteriana (UFC/mL) no momento da inoculação do leite e com 12 horas de incubação, em diversas temperaturas. Média de três repetições

Tempo	Temperatura		
	5°C	10°C	18°C
	----- UFC/mL -----		
Inicial	1,9 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶	9,3 x 10 ⁵
Com 12 horas	1,3 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	7,3 x 10 ⁶

crescimento dos microrganismos psicotróficos; porém, abusos de temperatura podem ocorrer devido a problemas operacionais, o que pode permitir que esses microrganismos aumentem substancialmente sua população no alimento.

Com relação à adesão bacteriana, observou-se (Figura 8) que, à medida que a temperatura aumenta, a porcentagem de bactérias aderidas também aumenta. Desta maneira, a adesão a 18° C foi de 5,83%, o que equivale a 3,2 x 10⁵ UFC/cm². Para 10° C verificou-se 1,95% de adesão, representando 2,0x10⁴ UFC/cm², e para 5° C constatou-se 1,36%, equivalente a 9,0 x 10³ UFC/cm².

A menor proporção de células aderidas em temperaturas mais baixas pode ser devido ao fato de a velocidade de multiplicação das bactérias ser menor nessas temperaturas. Também, a cinética de produção de exopolissacarídeos pode ter sua velocidade afetada negativamente pelo abaixamento da temperatura, além do fato de a mudança de viscosidade do leite poder dificultar a difusão da bactéria até a parede do cupom de prova. A alteração de viscosidade da gordura a 5° C pode fazer com que seja estabelecida uma camada gordurosa na parede dos cupons, dificultando a aproximação de novas bactérias e facilitando a consolidação da adesão das bactérias que estão entre a parede dos cupons e a camada de gordura.

Deve-se ressaltar que os resultados encontrados nesta pesquisa diferem dos encontrados por STONE e ZOTTOLA (1985), já que estes não encontraram diferença, na proporção de células aderidas, ao estudar a adesão de *P. fragi* em aço inoxidável nas temperaturas de 4 e 25° C, em leite desnatado. Os

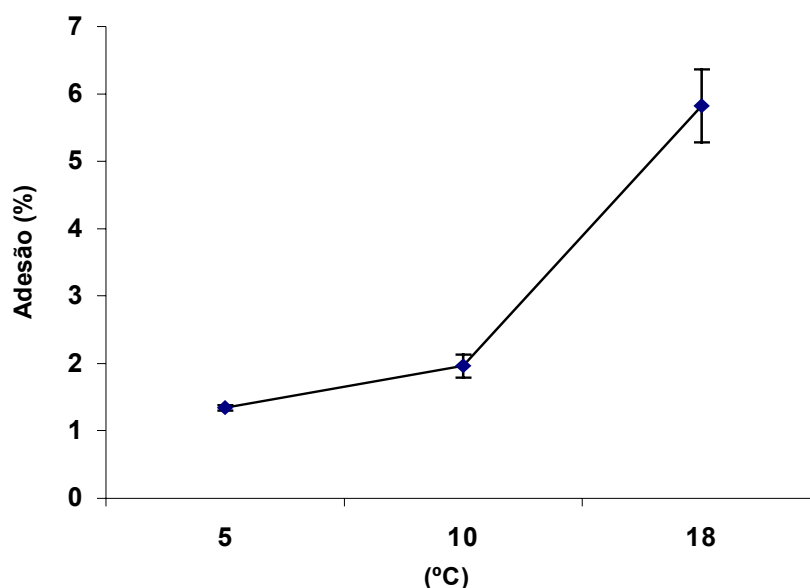


Figura 8 - Porcentagem de adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em cupons de aço inoxidável após 12 horas de incubação do leite, nas temperaturas de 5, 10 e 18° C.

autores observaram que o aparecimento de fibrilas de adesão em *P. fragi*, a 25° C, ocorreu em 0,5 hora, enquanto na temperatura de 4° C essas fibrilas foram observadas em 2 horas, o que demonstra uma menor velocidade de produção de exopolissacarídeos a 4° C, quando comparado a 25° C.

Diversos relatos de pesquisas mostram a influência da temperatura sobre a capacidade de adesão dos microrganismos às superfícies. Por exemplo, HOOD e ZOTTOLA (1995) observaram que *Y. enterocolitica* adere melhor ao aço inoxidável a 21° C, do que a 35 e 10° C. As células crescidas a 35° C não apresentavam flagelo, o que pode ter tido influência na sua incapacidade de aderir. É possível que a temperatura tenha um importante papel na formação de estruturas que ajudam no processo de adesão e que temperaturas próximas do ideal para o crescimento celular permitem maior quantidade de células aderidas. STONE e ZOTTOLA (1985) encontraram uma menor proporção de células aderidas a 3° C, quando comparada com a proporção de adesão celular a 20° C. Segundo MAFU (1990), células de *L. monocytogenes* são capazes de aderir em aço inoxidável, com fibrilas visíveis ao microscópio eletrônico, após 1 hora a 4 e 20° C. O autor relatou que

os pesquisadores Gelinás e Goulet observaram que *P. aeruginosa* pode aderir em superfícies de aço inoxidável, alumínio e polipropileno em 15 minutos, porém não foi citada a temperatura em que essa adesão ocorreu.

Mesmo em temperatura em que a bactéria não apresentou multiplicação, como a 5° C, ocorreu adesão, o que indica atividade metabólica para a produção de exopolímeros. Tal fato evidencia que, mesmo em condições de inibição de multiplicação celular, deve-se estar atento aos procedimentos de higienização de tanques de refrigeração de leite, a fim de impedir que biofilmes sejam formados.

Pode-se observar a porcentagem de bactérias que permaneceram aderidas após a circulação do leite no sistema-modelo (Figura 9). A 18° C, das células aderidas com 12 horas de incubação, 5,36% não foram removidas após a circulação do leite a 1m/s. Já para 10 e 5° C, os valores foram de 6,95 e 8,54%, respectivamente. Observa-se, portanto, uma pequena variação entre a maior e a menor porcentagem de adesão encontrada após a circulação do leite no modelo. Ainda assim, pode-se observar que existe a tendência de aumentar o percentual de bactérias que permanecem aderidas, após a circulação do leite, à medida que a temperatura diminui.

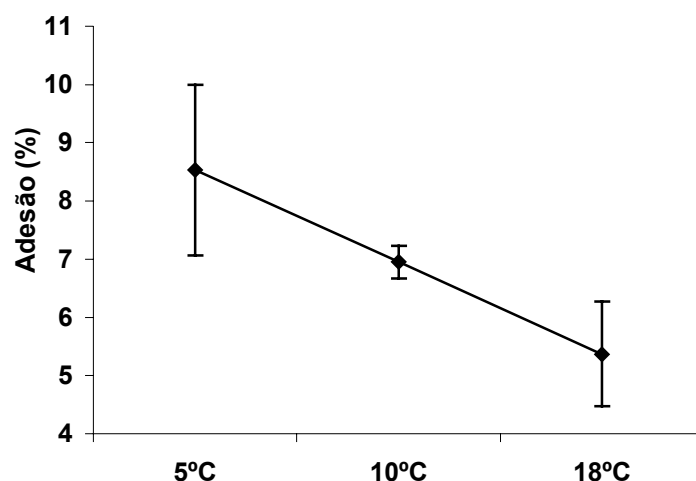


Figura 9 - Porcentagem de *Pseudomonas aeruginosa* que permaneceram aderidas em cupons de aço inoxidável após circulação do leite a 1 m/s, nas temperaturas de 5, 10 e 18° C.

É possível que em temperaturas mais baixas tenha se formado um filme, na parede dos cupons, composto basicamente de gordura e contendo pequena quantidade de outros nutrientes. Esse filme de resíduos pode ter dificultado a remoção de bactérias, possivelmente em função de sua maior espessura, quando a incubação foi realizada em temperaturas mais baixas.

Constata-se que, após a passagem do leite a uma velocidade de 1 m/s nos cupons de prova previamente incubados a 18° C, com leite contendo *P. aeruginosa*, a concentração bacteriana estava na ordem de $1,7 \times 10^4$ UFC/cm². Esta concentração foi de $1,4 \times 10^3$ UFC/cm² e $7,7 \times 10^2$ UFC/cm² quando a incubação para adesão bacteriana ocorreu a 10 e 5° C, respectivamente.

4.3. Efeito da velocidade de circulação do leite

A velocidade com que o leite deve ser bombeado, antes e depois do processamento, é muito importante não apenas em relação às características químicas do alimento, mas também por questões microbiológicas.

Os resultados deste trabalho demonstraram que o aumento da velocidade de circulação do leite exerce efeito positivo na remoção de células aderidas (Figura 10). Quando a velocidade de circulação foi de 0,5 m/s, 10,7% das células permaneceram aderidas aos cupons de prova, o que equivale a uma diminuição de $1,6 \times 10^5$ UFC/cm² para $1,7 \times 10^4$ UFC/cm². Para a velocidade de 1,0 m/s, a porcentagem de bactérias que resistiram ao fluxo foi de 5,36%, o que fez com que o número de bactérias aderidas mudasse de $3,2 \times 10^5$ UFC/cm² para $1,7 \times 10^4$ UFC/cm². A velocidade de 1,5 m/s permitiu que 4,9% das bactérias permanecessem aderidas, alterando o número de bactérias de $2,7 \times 10^5$ UFC/cm² para $1,3 \times 10^4$ UFC/cm², sendo o restante das células liberadas para o leite.

Portanto, pode-se observar que, à medida que o fluxo do leite aumenta, mais bactérias são removidas dos cupons. Deve-se considerar que tal fato implica maior grau de contaminação do alimento. Porém, uma menor remoção de células irá permitir que mais bactérias permaneçam aderidas ao equipamento.

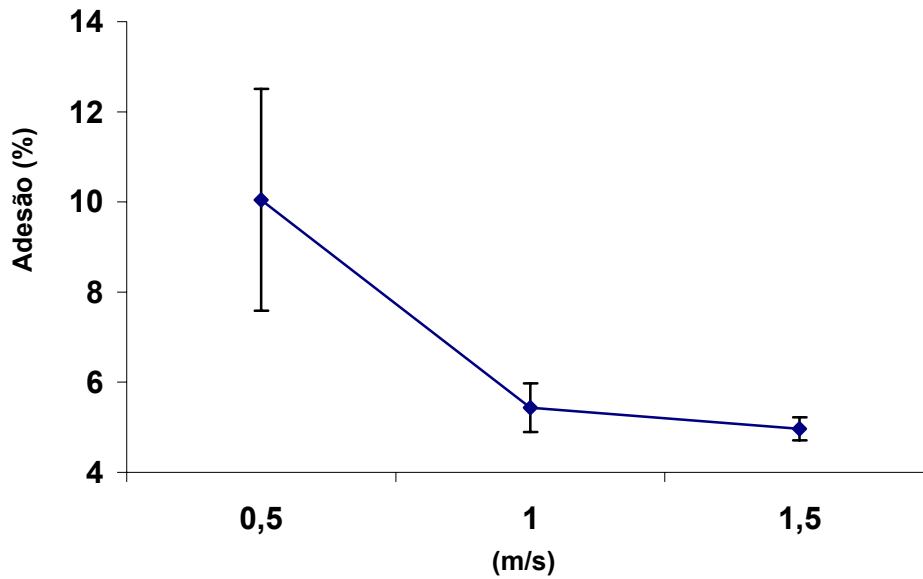


Figura 10 - Porcentagem de células de *Pseudomonas aeruginosa* que permanecem aderidas em cupons de aço inoxidável, independente do tipo de cupom, após a circulação do leite por 10 minutos a 15° C, em diferentes velocidades.

Observa-se que, caso a velocidade de circulação do leite seja muito baixa (0,5 m/s), pode haver um grande número de células aderidas nas tubulações, o que pode resultar em problemas de formação de biofilmes, se a higienização não for efetuada corretamente. Tal fato poderá ter duas conseqüências: 1) se a baixa velocidade de bombeamento do leite for antes do processamento, haverá a tendência de ocorrer um aumento no número de células aderidas nas tubulações. Essas células, ao se multiplicarem nessas superfícies, poderão liberar uma quantidade de bactérias cada vez maior para o leite. Se for considerado que a morte de microrganismos pelo calor ocorre de forma logarítmica, pode-se concluir que, quanto maior a contagem inicial, maior será a contagem microbiana após a pasteurização, o que compromete a qualidade do leite. Portanto, há a necessidade de evitar ao máximo que células aderidas venham a contaminar o produto; 2) se o problema da contaminação, a partir de microrganismos aderidos, ocorrer após o processamento térmico do produto, haverá contaminação pós-processamento do leite, devendo-se ressaltar que, no início do período de produção, essa contaminação será pequena, porém no fim do período de processamento a contaminação poderá

ser substancialmente maior. Ao considerar o fato de que determinados patógenos podem representar perigo à saúde, ainda que em baixas concentrações, pode-se concluir que mesmo a presença de poucas células no início do processo pode representar um risco crescente à saúde do consumidor, ao longo do período de produção. Segundo KUMAR e ANAND (1998), a célula bacteriana aderida cresce e se divide, usando os nutrientes presentes no filme condicionante e no meio circundante, o que leva à formação de microcolônias que se espalham sobre a superfície. Durante esse período, as células aderidas produzem polímeros adicionais, que ajudam na adesão das células à superfície.

Outra questão a considerar é que, se a velocidade de bombeamento for demasiadamente alta e a tubulação estiver contaminada, haverá, inicialmente, uma alta contaminação do leite em função da transferência de bactérias aderidas para o fluido, porém com o passar do tempo essa contaminação irá diminuir, pois apenas as células fortemente aderidas não serão removidas e o fluxo irá dificultar a adesão de novas células.

As velocidades utilizadas no experimento resultaram em fluxos que podem ser caracterizados como turbulentos, já que foram determinados os valores de número de Reynolds de 4.700, 9.400 e 14.100, para as velocidades de 0,5, 1,0 e 1,5 m/s, respectivamente. No entanto, os resultados mostram, no que se refere à adesão bacteriana, não haver diferença relevante entre as velocidades de 1 e 1,5 m/s.

Velocidades de mais de 1,5 m/s são freqüentemente utilizadas em processos de higienização, os quais podem se tornar deficientes se realizados em baixa velocidade (< 1,5 m/s), durante a limpeza do equipamento. Erros dessa natureza podem permitir que um grande número de bactérias permaneça aderido à superfície.

Observa-se que há tendência de permanecer um maior número de bactérias sésseis no cupom cilíndrico, independente da velocidade de bombeamento do leite (Quadro 8). Porém, deve-se ressaltar que, à medida que o fluxo do leite aumenta, o número de células aderidas diminui. Assim, foram constatadas porcentagens de adesão, no cupom cilíndrico, de 18,0, 11,9 e 10,1%, para as velocidades de 0,5, 1,0 e 1,5 m/s, respectivamente.

Quadro 8 - Porcentagem de *P. aeruginosa* que permaneceram aderidas aos diferentes tipos de cupons de aço inoxidável, submetidos às velocidades de 0,5, 1,0 e 1,5 m/s durante 10 minutos, em modelo de linha de processamento de leite, utilizando como fluido o leite integral a 15° C

Velocidades (m/s)	% Adesão		
	Cupom Cilíndrico	Cupom em Cotovelo	Cupom Tipo "T"
1,5	10,1	4,5	1,4
1,0	11,9	4,4	2,6
0,5	18,0	8,9	8,6

A menor adesão foi no cupom tipo "T", em todas as velocidades de bombeamento utilizadas, o que equivale a 8,6% para 0,5 m/s, 2,6% para 1 m/s e 1,4% para 1,5 m/s.

Em pesquisa realizada por MELLO (1997), utilizando adesão de *E. faecium* em cupons de aço inoxidável e depois circulando água a 1,5 m/s, foi obtida uma redução decimal de 0,52 no número de células aderidas, enquanto nesta pesquisa houve uma redução decimal de 1,3, utilizando o leite a 1,5 m/s. Fatores como tensão superficial, viscosidade e meio de incubação podem ter influenciado essa diferença.

4.4. Influência da concentração de bactérias na adesão

Verifica-se que o crescimento bacteriano, com 12 horas, foi inferior a um ciclo logarítmico em todas as concentrações de células utilizadas (Quadro 9), o que indica que a concentração de células não influenciou a capacidade de multiplicação.

A concentração de células com 12 horas de incubação influencia o número de células de *P. aeruginosa* aderidas aos cupons de aço inoxidável. A Figura 11 mostra que, em concentrações maiores de células, ocorre maior proporção de células aderidas. Assim, a concentração, com 12 horas, de $7,3 \times 10^6$ UFC/mL apresentou 5,83% das células aderidas, já as concentrações de $9,2 \times 10^5$ UFC/mL e $1,7 \times 10^5$ UFC/mL apresentaram porcentagens de adesão de 2,62 e 2,26%, respectivamente.

Quadro 9 - Contagem bacteriana (UFC/mL) no momento da inoculação do leite e com 12 horas de incubação a 18° C. Média de três repetições

Tempo	Concentração de Bactérias (UFC/mL)		
	1×10^6	1×10^5	1×10^4
Inicial	$9,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$
Com 12 horas	$7,3 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$

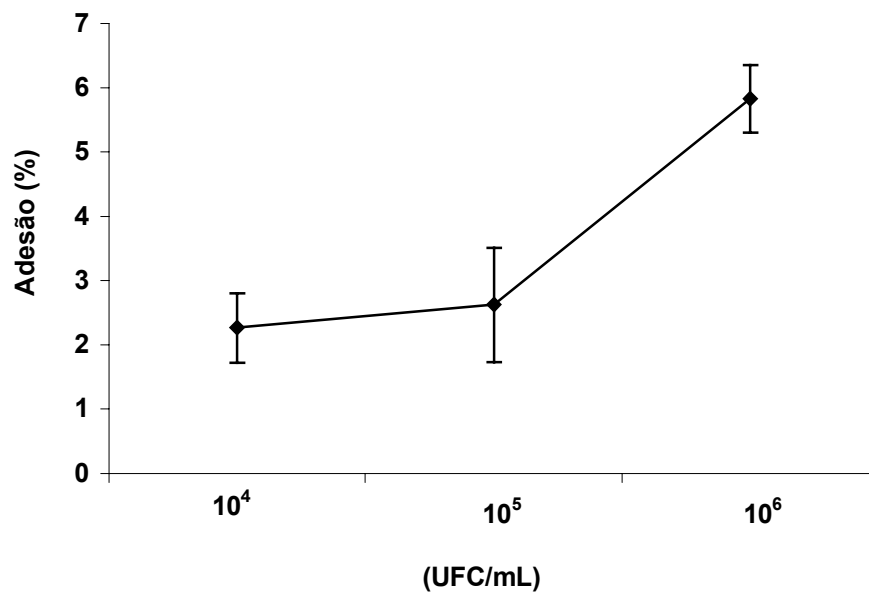


Figura 11 - Influência da concentração inicial de bactérias no leite, sobre a porcentagem de células aderidas aos cupons de prova, com 12 horas de incubação a 18° C. Média de três repetições.

Observou-se que, em números de células por unidade de área, os 5,83% de células aderidas corresponderam a $3,2 \times 10^5$ UFC/cm², enquanto os valores de 2,62 e 2,26% corresponderam a $9,8 \times 10^3$ UFC/cm² e $2,0 \times 10^3$ UFC/cm², respectivamente. Esses valores reforçam a necessidade de obter alimentos com baixo nível de contaminação microbiana, mesmo antes do processamento, já que tal fato implica menor número de bactérias aderidas à superfície e, portanto, menor contaminação do alimento que irá entrar em contato com aquela superfície.

Não há estudos que indiquem a quantidade máxima de microrganismos que podem estar presentes em uma superfície que entra em contato com o alimento, porém, para superfícies que passaram pelo processo de higienização, a “American Public Health Association” sugere um máximo de mesófilos aeróbios de $2,0 \times 10^0$ UFC/cm² (SVEUM, 1992).

Com relação aos resultados de adesão obtidos após a circulação do leite no modelo (Figura 12), verifica-se que a proporção de células que permanecem aderidas aos cupons de prova, calculada com base no número de células aderidas antes da circulação do leite no circuito de processamento, foi bastante próxima, independente da concentração inicial de células no leite. Assim, as porcentagens de adesão celular após a simulação foram de 5,36, 4,92 e 5,83%, para as concentrações de $7,3 \times 10^6$ UFC/mL, $9,2 \times 10^5$ UFC/mL e $1,7 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Essas porcentagens correspondem a $1,7 \times 10^4$ UFC/cm², $4,8 \times 10^2$ UFC/cm² e $1,2 \times 10^2$ UFC/cm², respectivamente.

É provável que as bactérias aderidas com maior tenacidade à superfície de aço inoxidável do modelo tenham sido aquelas que produziram maior quantidade de exopolissacarídeos, o que pode torná-las mais resistentes à ação de sanificantes. Segundo KUMAR e ANAND (1998), as substâncias associadas com o biofilme podem limitar a difusão de sanificantes no biofilme e provocar trocas fisiológicas nos microrganismos e produção de enzimas que degradam os sanificantes. Portanto, ainda que a contaminação da superfície seja relativamente baixa, como $1,2 \times 10^2$ UFC/cm², é difícil prever, após o período de produção, o grau de eficiência que os sanificantes terão contra essas bactérias.

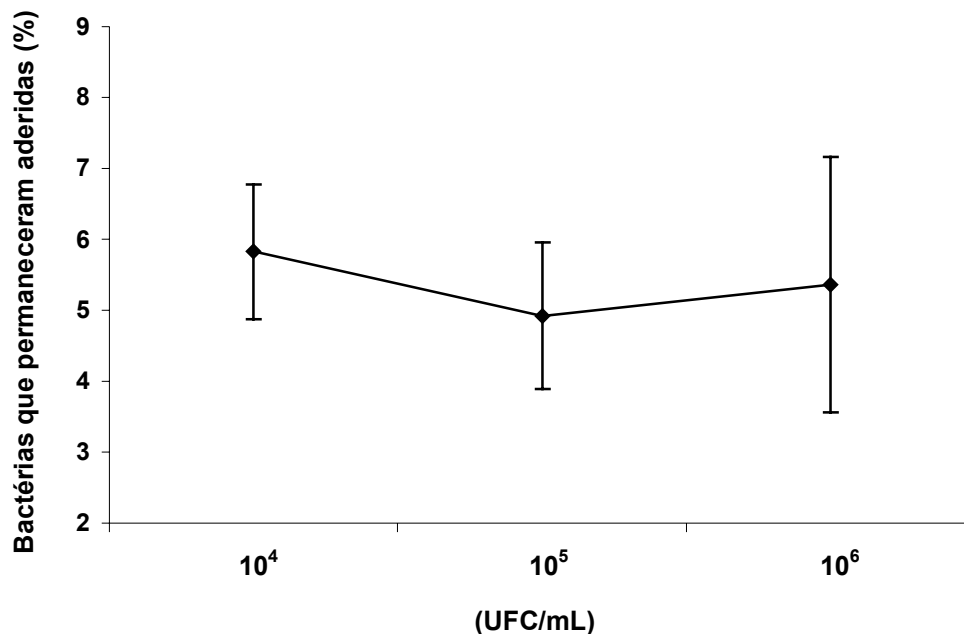


Figura 12 - Porcentagem de bactérias que permaneceram aderidas aos cupons de prova, após a circulação do leite a 1 m/s, em temperatura de 15° C, no simulador de linha de circulação de leite. Média de três repetições.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as que apresentam o tempo de geração mais curto, na faixa de 0 a 7° C, o que significa que a contaminação pós-processamento com bactérias desse gênero pode resultar em limitação do tempo de vida de prateleira do produto. No Brasil, o prazo de validade do leite pasteurizado é de dois dias, por isto as contaminações do produto com número baixo de bactérias não chegam a afetar a vida de prateleira do alimento. Para melhorar a qualidade e o tempo de vida de prateleira do leite pasteurizado no Brasil, é necessário, em primeiro lugar, reduzir ao máximo a contaminação a partir de equipamentos.

4.5. Influência do tempo de incubação do leite inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* sobre o processo de adesão

Observou-se que no leite incubado por um período de 12 horas houve uma alteração no número de células de 0,89 ciclo logarítmico (Quadro 10). Em relação ao leite incubado por 24 horas, observa-se que a alteração foi de 0,87

Quadro 10 - Contagem bacteriana (UFC/mL) no momento da inoculação do leite e com os períodos de incubação de 12, 24 e 48 horas, a 18° C. Média de três repetições

Tempo	Período de Incubação		
	12 horas	24 horas	48 horas
	----- UFC/mL -----		
Inicial	9,3 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁶	3,3 x 10 ⁶
Após incubação	7,3 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁸

ciclo logarítmico. É possível que a mudança da bactéria de um meio que continha caldo nutriente para o leite, juntamente com a alteração de temperatura de incubação de 35 para 18° C, tenha contribuído para o aumento da fase lag, resultando em uma multiplicação celular semelhante para os tempos de 12 e 24 horas. Para o leite incubado por 48 horas, verificou-se uma alteração de 1,82 ciclo logarítmico.

Portanto, constata-se que, em relação ao período de 48 horas de incubação, *P. aeruginosa* apresentou maior capacidade de multiplicação, o que, possivelmente, se deve à adaptação da bactéria às condições do meio.

No que se refere à adesão bacteriana, antes da circulação do leite no modelo, observa-se, pela Figura 13, que há tendência de mais células ficarem aderidas à medida que o tempo de incubação aumenta. Assim, verifica-se uma porcentagem de adesão de 48,7%, quando a incubação foi por 48 horas. Para 24 horas essa porcentagem foi de 7,65% e para 12 horas, de 5,83%.

Para 48 horas de incubação (48,7%), constata-se uma adesão de 5,5 x 10⁷ UFC/cm², o que caracteriza uma alta quantidade de células aderidas. Segundo ZOTTOLA (1997), esse número de células é suficiente para considerar a existência de um biofilme. Com relação aos 7,65% de adesão, obtidos após 24 horas, verifica-se que esse valor corresponde a 9,1 x 10⁵ UFC/cm², enquanto os 5,83%, obtidos para 12 horas de incubação, correspondem a 3,2 x 10⁵ UFC/cm².

Observa-se, portanto, que para leite armazenado por 12 e 24 horas a proporção de células que aderem é bem menor do que quando o leite é

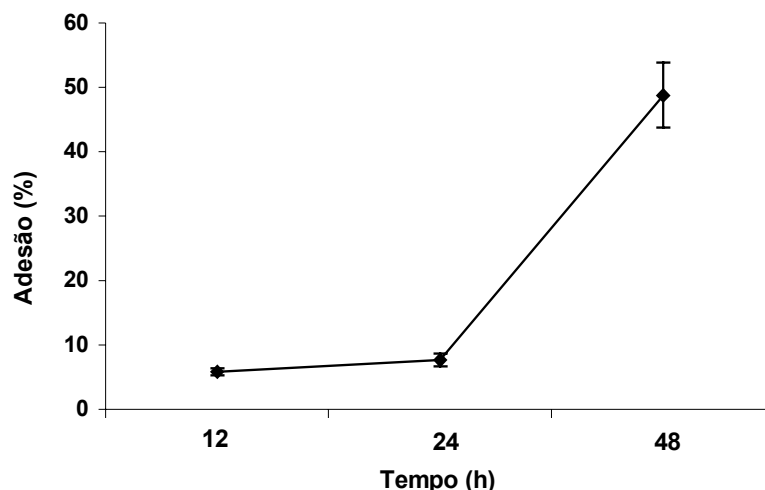


Figura 13 - Influência do tempo de incubação do leite inoculado com 10^6 UFC/mL sobre a porcentagem de células aderidas aos cupons de prova, a 18° C. Média de três repetições.

armazenado por 48 horas. Tal fato pode ter implicações na higienização do equipamento, uma vez que um alimento mantido armazenado por 48 horas, em condições de abuso de temperatura, permite a multiplicação de bactérias. Além disto, há mais tempo para que as bactérias possam aderir às paredes do equipamento, consolidar sua adesão e dar origem ao biofilme. Os tanques de armazenamento de leite, contendo grande número de bactérias aderidas, podem provocar um alto índice de contaminação do leite que for adicionado a esses depósitos.

ZOLTAI et al. (1981) demonstraram que, ao elevar o tempo de contato do microrganismo com a superfície, o número de células aderidas, o tamanho da microcolônia e o grau de adesão também aumentam. Além disto, ocorre o incremento da resistência a sanificantes. Uma pesquisa em que foi avaliada a ação de 1 e 0,1% de cloro residual total a 25° C, mostrou que biofilmes de *P. fluorescens*, *L. monocytogenes* e *B. subtilis* foram mais resistentes após 144 horas, quando comparado a 24 horas. Assim, a resistência ao cloro aumenta com a idade do biofilme (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

A comparação dos resultados encontrados neste estudo com os de outros pesquisadores é difícil, já que foram realizados experimentos em outras condições, como meio sintético utilizado em laboratório, tempo e temperatura

de incubação diferentes, entre outros. Porém ANDRADE et al. (1998), trabalhando com *E. faecium* em meio com MRS e aço inoxidável, obtiveram entre 10^5 e 10^6 UFC/cm², após 10 horas de incubação a 30° C. Tal resultado pode ser considerado um nível de adesão bastante alto, mas deve-se observar que a capacidade de adesão dos microrganismos aumenta em temperaturas que favorecem o crescimento.

KRYSINSKI et al. (1992), trabalhando com uma mistura de três estirpes de *L. monocytogenes*, observaram que, após 24 de incubação a 25° C, em tripticaseína e soja adicionadas de 8 g/L de glicose, os cupons de aço inoxidável apresentavam 2×10^4 UFC/cm² e que, com o aumento do período de incubação para 72 horas, o número de células aderidas não se alterava sensivelmente. MOSTELLER e BISHOP (1993) observaram que o tempo de adesão tem grande influência no aumento da resistência aos agentes antimicrobianos. Células aderidas por oito dias foram 100 vezes mais resistentes do que as aderidas por 4 horas, após 30 segundos de exposição a 200 ppm de hipoclorito de sódio, em pH 10 e temperatura de 25° C. Tal fato demonstra o efeito protetor do exopolissacarídeo sobre o biofilme.

Os resultados obtidos para a adesão bacteriana, após a circulação do leite pelo modelo (Figura 14), permitem concluir que a maior parte das células anteriormente aderidas não resiste ao fluxo de 1m/s, sendo, portanto, retiradas da parede dos cupons de prova.

Para 48 horas de incubação, a adesão, que foi de 48,7% antes da circulação do leite no simulador, baixou para 2,91%, após a circulação do leite a 1 m/s, o que significa dizer que sobrou $1,6 \times 10^6$ UFC/cm² aderida aos cupons de prova. Esse valor de 2,91%, apesar de ser proporcionalmente pequeno, apresenta um número de células por unidade de área suficientemente alto para colocar em risco a qualidade do alimento. É possível que, em virtude do tempo de 48 horas, as células bacterianas tenham formado um biofilme bastante espesso na parede dos cupons, porém por ocasião da circulação do leite a 1 m/s as bactérias posicionadas mais longe das paredes dos cupons não tenham resistido ao fluxo e, portanto, somente as células mais próximas da parede e fortemente aderidas tenham permanecido nos cupons de prova, daí a alteração de 48,7% antes da circulação do leite para 2,91 após a circulação.

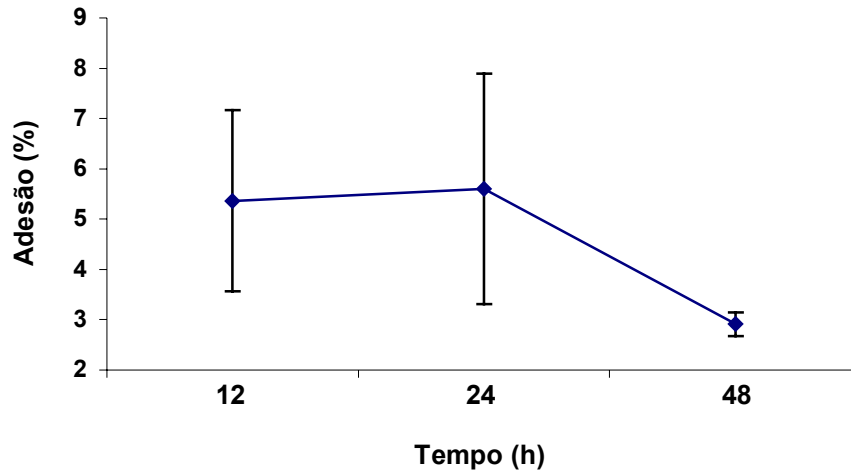


Figura 14 - Porcentagem de bactérias que resistem ao fluxo de 1 m/s de leite em modelo de linha de leite, após incubação a 18° C. Média de três repetições.

No tempo de 24 horas de incubação, houve adesão de 7,65%, antes da circulação do leite no modelo, e 5,6% das células, anteriormente aderidas, resistiram ao fluxo do leite, o que corresponde a $5,1 \times 10^4$ UFC/cm².

Quando a incubação foi por 12 horas, a porcentagem de adesão, que foi de 5,83% antes da circulação do leite no modelo, manteve-se bem próxima, com 5,36% de adesão após a circulação do leite a 1 m/s, o que corresponde a $1,7 \times 10^4$ UFC/cm².

Deve-se considerar que mesmo para uma adesão de 10^4 UFC/cm², a possibilidade de formação de biofilme a partir desses pontos é bastante provável. Além disso, essas células, por estarem fortemente aderidas e assim resistirem a um fluxo de 1 m/s, podem apresentar resistência ao processo de higienização de equipamento. Caso esses microrganismos permaneçam aderidos, poderá haver incorporação de outros tipos de microrganismos (patogênicos) no biofilme, o que pode colocar em risco a saúde do consumidor, já que alguns patogênicos podem causar enfermidades, mesmo em pequeno número.

MOSTELLER e BISHOP (1993) consideram eficientes as soluções sanitizantes que reduzissem ciclos logarítmicos as populações de *P. fluorescens*, *Y. enterocolitica* e *L. monocytogenes* aderidas em teflon e

borracha. Considerando que para o período de 48 horas de incubação $1,6 \times 10^6$ UFC/cm² permaneceu aderida; caso haja uma redução de três ciclos logarítmicos, essa população cairá para $1,6 \times 10^3$ UFC/cm², valor este ainda bastante alto para uma superfície higienizada.

Dentro do biofilme, a bactéria está continuamente crescendo, multiplicando e liberando células para o meio ambiente, o pode ser uma importante fonte de contaminação ou recontaminação do produto. Segundo MOSTELLER e BISHOP (1993), bactérias deterioradoras e patogênicas têm sido implicadas em processos de adesão, em superfícies comumente usadas em processamento de produtos lácteos. A prevenção é a chave para evitar a formação do biofilme. Uma vez que o biofilme esteja estabelecido, as operações de limpeza e sanificação se tornam bem mais difíceis.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

À medida que aumenta a necessidade de produzir alimentos em maiores quantidades, crescem também os riscos de contaminação desses alimentos. Os biofilmes bacterianos são capazes de se formar nos ambientes de processamento, a partir de processos complexos que se iniciam até mesmo com a adesão de uma única bactéria. Durante o processamento de alimentos, o tempo requerido para esse evento pode ser relativamente curto. Uma vez estabelecidos, esses biofilmes podem atuar como fonte de contaminação do alimento, originando problemas de deterioração e, ou, de saúde pública.

Com o objetivo de entender melhor os fatores envolvidos na adesão bacteriana aos equipamentos para processamento de alimentos, foi realizada uma série de experimentos num modelo de linha de circulação de leite, em aço inoxidável AISI 304, acoplado com cupons de prova.

Foram avaliadas as capacidade de adesão de *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, nas formas esporulada e vegetativa.

Observou-se, antes da circulação do leite no modelo, diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à capacidade de adesão ao aço inoxidável, dos três microrganismos avaliados. Assim, os esporos de *B. cereus* tiveram adesão de 24,6%, as formas vegetativa e esporulada apresentaram 2,21% de adesão e *P. aeruginosa* e *E. faecium* tiveram 5,83 e 0,57%, respectivamente.

Tais resultados evidenciam que os esporos de *B. cereus* apresentam a maior capacidade de adesão, quando comparados às demais formas avaliadas.

Depois da circulação do leite pelo modelo de circuito de processamento, não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) com relação ao número de bactérias que permanecem aderidas, entre os microrganismos, tendo os percentuais de adesão sido de 4,1% para esporos de *B. cereus*, 2,3% para *B. cereus* nas formas esporulada e vegetativa, 5,36% para *P. aeruginosa* e 5,51% para *E. faecium*.

Quando o experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura de refrigeração do leite na adesão bacteriana, observou-se uma alteração nas porcentagens de adesão antes e após a circulação do leite. *P. aeruginosa*, quando incubada a 5° C, apresentou adesão de 1,36% antes da circulação do leite, devendo-se ressaltar que deste total 8,54% permaneceram aderida, após a circulação. Já para 10° C, a mudança foi de 1,95% de adesão antes para 6,95%, após a circulação, e a 18° C, os valores encontrados foram de 5,83%, antes da circulação do leite no modelo e 5,36%, após a circulação. Portanto, verifica-se que, em relação à adesão antes da circulação do leite no modelo, há uma tendência de maior proporção de células permanecer aderida à medida que a temperatura aumenta. Porém, essa tendência não se confirma para os resultados obtidos após a circulação do leite no modelo.

Com relação à influência da velocidade de circulação do leite no modelo, verificou-se que a 0,5 m/s permaneceu aderida aos cupons de prova 10,7% das células, enquanto nas velocidades de 1,0 e 1,5 m/s as porcentagens de adesão foram de 5,36 e 4,9%, respectivamente. Tal resultado evidencia a tendência de a maior proporção de células permanecer aderida à medida que fluxos mais baixos sejam utilizados.

Quando foi avaliada a influência da concentração de bactérias em relação à adesão bacteriana, verificou-se uma alteração de 5,83%, antes da circulação do leite, para 5,36%, após a circulação, quando a concentração de $9,3 \times 10^5$ UFC/mL foi utilizada. Para a concentração de $2,2 \times 10^5$ UFC/mL, a alteração na adesão foi de 2,62 para 4,92%, após a circulação do leite; já para a concentração de $2,9 \times 10^4$ UFC/ml, a mudança foi de 2,26 para 5,83%. Portanto, com o aumento da concentração de células no leite, aumenta

também a porcentagem de células aderidas aos cupons de prova antes da circulação do leite pelo modelo, porém após a circulação do leite a porcentagem de células que permanecem aderidas é praticamente igual, independente da concentração celular.

A influência do tempo de incubação do leite sobre a adesão mostrou que, quando o período de incubação foi de 12 horas, a adesão bacteriana foi de 5,83%, antes da circulação do leite, e de 5,36%, após a sua circulação. Para 24 horas de incubação do leite, constatou-se 7,65% de adesão antes e 5,6% depois da circulação. Já para 48 horas, a adesão foi de 48,7% antes da circulação, devendo-se ressaltar que 2,91% continuaram aderidas, após a circulação do leite. Tal fato demonstra que, à medida que o tempo de incubação aumenta, a porcentagem de bactérias aderidas também aumenta. Porém, quando o leite é circulado dentro dos cupons de prova a 1 m/s, a maioria das bactérias é removida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.M., BORACH, T.T., SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.6, p.829-835, 1975.
- ANDERSON, J.A.G. Thermic inactivation of thermoresistant lipase produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.361-367, 1979.
- ANDERSSON, A., RONNER, U., GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, n.28, p.145-155, 1995.
- ANDRADE, N.J., AJAO, D.B., ZOTTOLA, E.A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food Protection**, n.11, v.61, p.1454-1458, 1998.
- ASSANTA, M.A., ROY, D., MONTPETIT, D. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to water distribution system pipes after different contact times. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1321-1329, 1998.
- AUSTIN, J.W., BERGERSON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal Dairy Research**, v.62, p.509-519, 1995.
- AUSTIN, J.W., SANDERS, G., KAY, W.W., COLLINSON, S.K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS Microbial Lett.**, n.162, p.295-301, 1998.
- BIGALKE, D. Identification of post-pasteurization milk contamination. **Food Ind. of South Africa**, v.48, p.49, 1983.

- BLOMFIELD, S.F., ARTHUR, M., KLINGEREN, B.V., PULLEN, W., HOLAH, J.T., ELTON, R. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. **Journal Applied Bacteriology**, v.76, p.86-94, 1994.
- BOUMAN, S., LUND, D. B., DRIESSEN, F.M., SCHMIDT. Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times. **Journal Food Protection**, v.45, p.806-812, 1982.
- BOWER, C.K., McGUIRE, J., DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.152-157, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Decreto n. 81.771, 7. Jun. 1978. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de ago. 1993. Seção 1, p. 11937.
- BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7ed. New Jersey: Prentice Hall, 1994. 909p.
- BUSSCHER, H.J., WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substratum. **FEMS Microbiology**, v.46, p.165-173, 1987.
- BUZBY, J.C., ROBERTS, T., LIN, C.T.J., MACDONALD, J.M. **Bacterial foodborne disease: Medical costs and productivity losses**. USDA, USA. Report number 741, 1996. 91p.
- CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal Applied Bacteriology**, v.75, p.499-511, 1993.
- CELESTINO, E.L., LYER, M., ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.51, p.59-63, 1996.
- COLLINS, E.B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.1, p.157-160, 1981.
- COLLINS, S.J., BESTER, B.H., MCGILL, A.E.J. Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. **Journal Food Protection**, v.56, n.5, p.418-425, 1993.

- COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Rev. Microbiol.**, v.41, p.435-464, 1987.
- COSTERTON, J.W., LAPPIN-SCOTT, H.M. Behavior of bacteria in biofilms. **ASM News**, v.55, n.12, p.650-654, 1989.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., DeBEER, D., CARDWELL, D., KORBER, D., JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.8, p.2137-2142, 1994.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CARDWELL, D., KORBER, D., LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Rev. Microbiol.**, n.49, p.711-745. 1995.
- COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. **Journal Food Protection**, v.45, n.2, p.177-207, 1982.
- COUSIN, S.A., MARTH, E.H. Changes in milk protein caused by psychrotrophic bacteria. **Milchwissenschaft**, v.32, p.337-341, 1977.
- CREMIEUX, A., FLEURETTE, J. Methods of testing disinfectants. In: BLOCK, S.S. (Ed.) **Disinfections, sterilization, and preservation**. 4th ed. Pennsylvania: Lea & Febiger, Malvern, Cap. 57. p.1009-1027, 1991.
- CRIADO, M.T., SUÁREZ, B., FERREIRÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. **Food Technology**, v.48, n.2, p.123-126, 1994.
- CZECHOWSKI, M.H. Cleaning and sanitation. **Australian Journal Dairy Technology**, p.38-39, 1990.
- DALTON, H.M., MARCH, P.E. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.252-255, 1998.
- DEAGOSTINO, L., GOODMAN, A.E., MARSHALL, K.C. Physiological responses induced in bacterial adhering to surfaces. **Biofouling**, n.4, p.113-119, 1991.
- DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.
- DENYER, S.P., GORMAN, S.P., SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control**. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1993. 333p.
- DESROSIER, J.P., LARA, J.C. Isolation and properties of pili from spores of *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v.145, n.1, p.613-619, 1981.

- DOYLE, M.P. A new generation of foodborne pathogens. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.12, n.8, p.490-493, 1992.
- FIGUEIREDO, H.M. **Produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo e sua estabilidade em leite em pó e leite fluído**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- FLINT, S.H., BREMER, P.J., BROOKS, J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant - Description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, v.11, n.1, p.81-87, 1997.
- FRANK, J.F., CHRISTEN, G.L., BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed). **Standard methods for the examination of dairy product**. Washington, DC: American Public Health, 1992. p.271-281.
- FRANK, J.H., KOFI, R.A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal Food Protection**, v.53, n.7, p.550-554, 1990.
- FRAZIER, W.C. **Microbiologia de los alimentos**. 2.ed. España: Editora Acribia, 1988. 492p.
- FUQUA, C., WINNANS, S.C., GREENBERG, E.P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annual Rev. Microbiol.**, n.50, p.727-751. 1996.
- GIFFEL, M.C., BEUMER, R.R., GRANUM, P.E., ROMBOUTS, F.M. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.307-318, 1997.
- HERALD, P.J., ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal Food Protection**, v.51, n.6, p.445-448, 1988.
- HOOD, S., ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v.6, p.8-18, 1995.
- HUP, G., BANGMA, A., STADHOUDERS, J., BOUMAN, S. Growth of thermoresistant streptococci in cheese milk pasteurizers, (1) Some observations in cheese making. **Zuivelzicht**, v.71, p.1014-1016, 1979.
- JASPE, A., FERNANDEZ, L., PALACIOS, P., SANJOSE, C. Interaction between *Pseudomonas fluorescens* and lactic starter Hansen n°. 44 in milk at 7°C. **Milchwissenschaft**, v.50, p.607-610, 1995.

- JAY, M.J. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.
- JEONG, D.K., FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 °C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal Food Protection**, v.57, n.7, p.576-586, 1994.
- KRYSINSKI, E.P., BROWN, L.J., MARCHISELLO, T.J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal Food Protection**, v.55, n.4, p.246-251, 1992.
- KUMAR, C.G., ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9-27, 1998.
- LARSEN, H.D., JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in danish pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.179-186, 1997.
- LE CHEVALLIER, M.W., CAWTHON, C.D., LEE, R.G. Inactivation of biofilm bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2492-2499, 1988.
- LEWIS, S.J., GILMOUR, A. Microflora associated with the internal surfaces of rubber and stainless steel milk transfer pipelines. **Journal Applied Bacteriology**, v.62, p.327-333, 1987.
- LIMA, M.C. **Efeitos de tratamentos térmicos do leite tipo C em grupos de microrganismos e em seu desenvolvimento durante a estocagem a diferentes temperaturas**. Viçosa, MG: UFV, 1988. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- MAFU, A.A., ROY, D., GOULET, J., MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal Food Protection**, v.53, n.9, p.742-746, 1990.
- MARSHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. **American Soc. Microbiol News**, v.58, p.202-207, 1992.
- MARSZALEK, D.S., GERCHAKOV, S.M., UDEY, L.R. Influence of substrate composition on marine microfouling. **Applied and Environmental Microbiology**, n.38, p.987-995, 1979
- MARTIN, J.H. Heat resistant microorganisms in dairy food sistem-heat resistant mesophilic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.149-156, 1981.

- MEER, R.R., WODBURN, M.J., BODYFELT, F.W. Identification and characterization of heat-resistant psychrotrophic bacteria in Oregon grade A raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.13, n.11, p.631-637, 1993.
- MELLO, C.A. **Avaliação da eficiência de sanificantes químicos em condições de uso simulado sobre psicrotróficos acidificantes**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MIKOLAJCIK, E.M., SIMON, N.T. Heat resistant psychrotrophic bacteria in raw milk and their growth at 7°C. **Journal Food Protection**, v.42, n.2, p.93-95, 1978.
- MORAES, M.S.V., ANDRADE, N.J., CHAVES, J.B.P., PASSOS, F.J.V., GOMIDE, L.A.M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.325-329, 1997.
- MOSTELLER, T.M., BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal Food Protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.
- NOTERMANS, S. The significance of biofouling to the food industry. **Food Technology**, v.7, p.13-14, 1994.
- O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS356 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, n.28, p.449-461, 1998a.
- O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, n.30, p.295-305, 1998b.
- PALMER, J. **Hygienic milk production and equipment cleaning**. New Zealand: Fermoy: Moorepark Research Centre, 1998. 47p.
- RESTAINO, L., FRAMPTON, E.W., BLUESTEIN, R.L., HEMPHIL, J.B., REGUTTI, R.R. Antimicrobial efficacy of a new organic acid anionic surfactant against various bacterial strains. **Journal Food Protection**, v.57, n.6, p.496-501, 1994.
- ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology: the microbiology of milk**. 2.ed. New York: Elsevier Applied Science, 1990. v.1.
- RONNER, U., HUSMARK, U., HENRIKSSON, A. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, p.550-556, 1990.

- SAMSONOFF, W.A., HASHIMOTO, T., CONTI, S.F. Ultrastructural changes associated with germination and outgrowth of an appendage-bearing *Clostridial* spore. **Journal of Bacteriology**, v.101, n.3, p.1038-1045, 1970.
- SASAHARA, K.C., ZOTTOLA, E.A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal Food Protection**, v.56, n.12, p.1022-1028, 1993.
- SCHWACH, T.S., ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopy study on some effects of sodium hipoclorite on attachment of bacteria to stainless steel. **Journal Food Protection**, v.47, n.10, p.756-759, 1984.
- SENYK, G.F., ZALL, R.R., SHIPE, W.F. Subpasteurization heat treatment to inactivate lipase and control bacteriological growth in raw milk. **Journal Food Protection**, v.45, n.6, p.513-515, 1982.
- SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, n.8, p.432-437, 1994.
- SMITH, J.L., FRATAMICO, P.M. Factors involved in the emergence and persistence at food-borne diseases. **Journal Food Protection**, v.58, n.6, p.696-708, 1995.
- SNYDER, JR, O.P. Control of surface microorganisms and biofilms. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.12, n.7, p.525-529, 1992.
- SORHAUG, T., STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, 1997.
- STICKLER, D. Biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, v.2, p.270-275, 1999.
- STONE, L.S., ZOTTOLA, E.A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, v.50, p.957-960, 1985.
- STONE, L.S., ZOTTOLA, E.A. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. **Journal of Food Science**, v.50, p.951-956, 1985.
- SUÁREZ, B., FERREIRÓS, C.M. Psychrotrophic flora of raw milk: resistance to several common desinfectants. **Journal Dairy Research**, v.58, n.1, p.127-136, 1991.

- SVEUM, W.H., MORBERG, L.J., RUDE, R., FRANK, J.F. Microbiological monitoring of food processing environment. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. APHA, cap.3, p.51-74, 1992.
- TROLLER, J.A. **Sanitation in food processing**. 2. ed. New York: Academic Press, Cap 5. p.52-69, 1993.
- ZOLTAI, P.T., ZOTTOLA, E.A., MCKAY, L.L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. **Journal Food Protection**, v.44, n.3, p.204-208, 1981.
- ZOTTOLA, E.A. Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: TORTORELLO, M.L., GENDEL, S. M. (Eds.) **Food microbial analysis – new technologies**. IFT basic symposium series. Marcell Dekker, INC. Cap. 16 p. 315-3346, 1997.
- ZOTTOLA, E.A., SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing - should they be a concern? **Int. J. Food Micro.**, v.23, p.125-148, 1994.