

**ANA DIOLINA SOARES MACHADO**

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Pseudomonas fluorescens* EM BIOFILMES E  
DETECÇÃO DAS CÉLULAS POR ANTI-SORO POLICLONAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

**ANA DIOLINA SOARES MACHADO**

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Pseudomonas fluorescens* EM BIOFILMES E  
DETECÇÃO DAS CÉLULAS POR ANTI-SORO POLICLONAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2006.

---

Prof. José Mário da Silveira Mezencio  
(Conselheiro)

---

Prof. Nélio José de Andrade  
(Conselheiro)

---

Dr<sup>a</sup> Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

---

Prof<sup>a</sup> Maria Beatriz Abreu Glória

---

Prof<sup>a</sup> Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela alta qualidade de formação oferecida.

Em especial, à prof<sup>a</sup> Maria Cristina Dantas Vanetti que, mais que uma orientadora, é a amiga que conduz todo o processo e formação de seus orientados.

Ao prof. José Mário da Silveira Mezencio, pelos ensinamentos e pela constante colaboração do desenvolvimento dos trabalhos.

Ao prof. Nélio José de Andrade, pelas orientações e contínua disposição para ensinar.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela atenção e postura amiga, sempre disponível a ajudar.

Aos professores do Departamento de Microbiologia da UFV, pelos ensinamentos enriquecedores que muito representam em minha formação.

A FAPEMIG, pelo apoio ao Projeto de Pesquisa.

À Dra. Cláudia Alencar Vanetti, pela valiosa colaboração e pelas lições nos trabalhos em microscopia eletrônica de varredura.

À Dra Virginia Maria Chaves Alves, pela imensa ajuda nos trabalhos de pressurização das células, no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos.

A todos que, no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, auxiliaram-me e permitiram a utilização do espectrofotômetro.

Aos professores, funcionária e alunos do Laboratório de Diversidade Microbiológica, pela concessão do aparelho de ultra-som, e pelo auxílio na sua utilização.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya e ao aluno de pós graduação, André, pelo auxílio na utilização de microscópio de epifluorescência e na execução das fotografias.

A Marília Magalhães Gonçalves, bolsista de iniciação científica do Departamento de Microbiologia, pela amizade, pelo companheirismo e pela imensurável ajuda na execução dos experimentos.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Patógenos, pela convivência agradável e pelo auxílio, sempre que necessários.

À Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pela inestimável contribuição, pela transferência de experiência e principalmente pela amizade.

A Nilcéa, Aparecida e Laura, que, na secretaria, prestam eficiente e amigável assistência aos que procuram assessoria no Departamento de Microbiologia.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia da UFV, Sr. José Reinaldo, Sr. Cesário, Sr. Paulo, Sr. José Carlos e Pablo; do Bioagro, Sr. Danilo, Sr. Evandro, Sr. Antonio e Sr. Paulo; e da oficina de hialotécnica Sr. “Pardal” e Sr. Eugênio, pelo pronto atendimento e resolução de problemas.

Ao Sr. Francisco que, no Laboratório de Imunologia, prestou grande auxílio na realização dos experimentos.

Ao Sr. Jorge, pela grande ajuda na produção de instrumentos de sustentação de cupons e pelo solidário e carinhoso cuidado com os coelhos.

Aos colegas e companheiros, de todas as disciplinas cursadas, pela convivência solidária.

Às amigas Dra. Keily Alves de Moura Oliveira e Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes, Renata Pawlow Torres e Eliana Santos, grandes companhias em vivências no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

À professora Maria Beatriz de Abreu Glória, do Departamento de Alimentos da FAFAR-UFMG, pela disponibilidade e participação na banca examinadora deste estudo.

A Consultora de Redação Científica e Revisora Lingüística, mestra Rozimar Gomes da Silva Ferreira, pela dedicação, pelas valiosas orientações e pela execução dos trabalhos de elaboração final dos exemplares desta tese.

À Sandra Correa, funcionária da UFMG, pela grande colaboração na elaboração dos gráficos e na formatação do texto.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Faculdade de Farmácia da UFMG, pela concessão desta oportunidade promotora de qualificação e desenvolvimento profissional.

Ao professor Gerson Antônio Pianetti, ex-diretor da FAFAR-UFMG e à prof<sup>a</sup> Jane Maciel Almeida Baptista, atual diretora, que, investidos da função de dirigir e administrar a Instituição, gerem também seus funcionários, abrindo-lhes portas.

Em especial, ao prof. José Virgílio Coelho, chefe do Departamento de Alimentos da FAFAR-UFMG, pelo apoio incondicional e estímulo que possibilitaram a conclusão de meu doutorado.

Aos funcionários da FAFAR que, na posição de colegas, apoiaram minha decisão de investir nesta Pós-Graduação.

Aos meus familiares Maria Lúcia, Gláucia, José Oswaldo, Vânia Lúcia, Hilton, Wanilda e Bernadete, grande torcida, solidária e promotora de alegrias.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para concretização destes trabalhos.

Ao Gerente Maior que sempre nos apresenta soluções nos momentos certos, o Deus de toda força e poder.

Aos que se foram, mas permanecem presentes  
em minhas lembranças e fazem-me plena de saudades:

Meus pais, Oswaldo e Lilia, grandes referências  
de valores pessoais;

Meu irmão, Arnaldo, grande amigo,  
companheiro e apoio em minhas propostas;

Ao Hélder, companheiro de longa jornada,  
sempre presente compartilhando o dia a dia, o nosso  
crescimento pessoal nas vitórias e derrotas,

Dedico e homenageio.

## **BIOGRAFIA**

ANA DIOLINA SOARES MACHADO, filha de Oswaldo e Maria Soares Machado, é natural de Piumhi, Minas Gerais.

No Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte – MG, graduou-se em Ciências Biológicas e, em 1986, concluiu o Mestrado em Microbiologia, na área de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

Em agosto de 2000, iniciou o curso de Doutorado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, concluindo-o em fevereiro de 2006.

Atuou como professora de Biologia em diferentes instituições de ensino, no período de 1975 a 1979. Foi responsável pela cadeira de Microbiologia e Imunologia no curso de Biologia da Faculdade Metodista Izabela Hendrix, em Belo Horizonte, no período de 1981 a 1988. Ministrou a disciplina Introdução a Biologia de Microrganismos do Curso de Especialização em Microbiologia no XVII e no XIX Programa de Pós-Graduação “Lato-sensu” da Pontifca Universidade Católica de Minas Gerais, em 1989 e 1991. Atualmente, é Técnica de Laboratório no Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Enzimas de psicrotróficos em leite .....	3
2.2. Biofilmes.....	7
2.2.1. Formação e estrutura dos biofilmes .....	8
2.2.2. Sistemas para estudos dos biofilmes.....	12
2.3. Métodos de determinação de microbiota psicrotrófica contaminante do leite ....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Manutenção e ativação de <i>P. fluorescens</i> .....	22
3.2. Avaliação da adesão e da formação de biofilmes a diferentes temperaturas.....	23
3.2.1. Preparo de cupons de aço inoxidável.....	23
3.2.2. Determinação da adesão da cultura mista de <i>P. fluorescens</i> .....	24
3.2.3. Adesão e formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável por <i>P.</i> <i>fluorescens</i> 041 e 097 .....	25
3.2.4. Quantificação de células planctônicas .....	25
3.2.5. Quantificação de células aderidas.....	26
3.2.6. Observação de adesão e de biofilmes ao microscópio eletrônico de varredura .....	26
3.3. Determinação da atividade proteolítica .....	27
3.4. Preparo de antígenos e imunógenos e técnicas imunológicas desenvolvidas.....	27
3.4.1. Preparo de massas celulares imunogênica e antigênica.....	27
3.4.2. Produção de anti-soros policlonais contra <i>P. fluorescens</i> .....	28
3.4.3. Preparo dos antígenos para titulação dos anti-soros .....	29

3.4.4. Técnica de aglutinação em gota.....	30
3.4.5. Técnica de imunodifusão dupla .....	31
3.4.6. Técnica de imunodot-blot .....	31
3.4.7. Detecção de <i>P. fluorescens</i> em LDR 12% .....	32
3.4.8. Determinação de reação cruzada dos anti-soros policlonais contra <i>P. fluorescens</i> .....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1. Adesão e formação de biofilmes por <i>P. fluorescens</i> a diferentes temperaturas... 34	34
4.2. Atividade proteolítica de células planctônicas e aderidas de <i>P. fluorescens</i> .....	47
4.3. Produção de anticorpos policlonais contra <i>P. fluorescens</i> .....	53
4.3.1. Titulação dos anti-soros obtidos pela técnica de aglutinação em gota .....	53
4.3.2. Titulação dos anti-soros obtidos pela técnica de imunodifusão dupla.....	55
4.3.3. Titulação dos anti-soros obtidos pela técnica de imunodot-blot.....	57
4.4. Detecção de <i>P. fluorescens</i> em LDR 12% .....	58
4.4.1. Detecção de <i>P. fluorescens</i> em LDR 12% pela técnica de aglutinação em gota.....	58
4.4.2. Detecção de <i>P. fluorescens</i> em LDR 12% pela técnica de imunodot-blot ...	59
4.4.3. Reação cruzada dos anticorpos policlonais contra <i>P. fluorescens</i> .....	62
5. CONCLUSÕES .....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## RESUMO

MACHADO, Ana Diolina Soares, D.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: José Mário da Silveira Mezencio e Nélio José de Andrade.

Os objetivos deste trabalho foram investigar a formação de biofilmes por estirpes de *Pseudomonas fluorescens* isoladas de leite cru refrigerado e a atividade proteolítica nesses biofilmes. Pesquisou-se, também, a viabilidade de detecção dessas células no leite, por métodos imunológicos. O potencial de desenvolvimento de biofilmes em superfície de aço inoxidável AISI 304 acabamento # 4 foi avaliado em temperaturas de 7 °C e 22 °C. O número de células de uma cultura mista constituída de sete estirpes de *P. fluorescens*, aderidas a placas de aço inoxidável aumentou, proporcionalmente ao aumento da população de células planctônicas, atingindo em torno de  $10^8$  UFC-CFU.mL<sup>-1</sup>, após 72 h de incubação em leite desnatado reconstituído (LDR) a 12%, a 22 °C. A maior atividade proteolítica constatada no sobrenadante de LDR 12% em presença de placas de aço inoxidável com células aderidas que, em ausência, sugere que células aderidas, ou, em biofilmes, podem secretar enzimas para o meio externo. A avaliação da adesão de células de culturas puras de *P. fluorescens* 041 e 097, em meio triptona extrato de levedura e fosfato (TYEP) e em LDR 1% ou 12%, indicou que o meio TYEP estimulou crescimento, mas, não a atividade proteolítica a 7 °C e 22 °C. Constatou-se que a capacidade de adesão com desenvolvimento de

biofilmes é diferente entre as estirpes de uma mesma espécie. Adesão, formação de biofilmes e a atividade proteolítica são propriedades independentes, nas bactérias avaliadas. *P. fluorescens* 041 apresentou baixa capacidade de adesão a placas de aço inoxidável a 7 °C e uma alta atividade proteolítica, enquanto o número de células aderidas de *P. fluorescens* 097 foi da ordem de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> a 7 °C e 22 °C, mas apresentou atividade proteolítica menor. A observação dos biofilmes em microscópio eletrônico de varredura evidenciou que *P. fluorescens* 097 formou aglomerados com multicamadas celulares na superfície das placas de aço inoxidável. Anti-soros policlonais produzidos em nove coelhos contra misturas de estirpes de *P. fluorescens* apresentaram sensibilidades diferentes, com capacidade de detecção de células em concentrações que variaram de  $10^3$  UFC-CFU.mL<sup>-1</sup> a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Os anti-soros produzidos não apresentaram reação cruzada com outras espécies bacterianas contaminantes do leite cru refrigerado, à exceção dos anti-soros 2A e 3A que reagiram com *Aeromonas*. Aplicando-se técnicas de aglutinação em gota e de imunodot-blot, foram detectadas células de *P. fluorescens* em LDR 12% em concentrações de  $10^3$  UFC-CFU.mL<sup>-1</sup> e  $10^5$  UFC-CFU.mL<sup>-1</sup>. Estes resultados indicam o potencial desses procedimentos, para detectar células das bactérias deterioradoras, em uma faixa de concentração não-comprometedora da qualidade do leite.

## ABSTRACT

MACHADO, Ana Diolina Soares, D.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* in biofilms and cell detection with polyclonal antiserum.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee Members: José Mário da Silveira Mezencio and Nélio José de Andrade.

The purposes of this work were to investigate the formation of biofilms from *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from cold raw milk and proteolytic activity in these biofilms. Viability to detect these cells in milk was also investigated through immunological methods. Potential development of biofilms in AISI 304 stainless steel surface, finishing #4 was evaluated under temperatures of 7 °C and 22 °C. The number of cells from a mixed culture composed of seven *P. fluorescens* strains adhered to stainless steel plates increased proportionally to the increase of planktonic cell population reaching about  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> after 72 hours of incubation in 12% reconstituted skimmed milk (RSM) at 22 °C. Proteolytic activity verified in RSM supernatant 12% in the presence of stainless steel with adhered cells was higher than in the absence, which suggests that adhered cells, or in biofilms may secrete enzymes to the external medium. The evaluation of cell growth from pure *P. fluorescens* cultures 041 and 097 in tryptone, yeast extract, phosphate (TYEP) medium and in RSM 1%, or 12% has indicated that TYEP medium stimulated growth, but not proteolytic activity at 7 °C and 22 °C. It was verified that adhesion capacity with the development of biofilms is different among strains from the same species. Adhesion capacity with the

development of biofilms and proteolytic activity are independent properties in the bacteria tested. *P. fluorescens* 041 presented low adhesion capacity to stainless steel plates at 7°C and high proteolytic activity whereas the number of *P. fluorescens* 097 adhered cells was about  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> at 7 °C and 22°C. Proteolytic activity, however, was lower. Biofilm investigation with scanning electron microscope made clear that *P. fluorescens* 097 has formed multilayered cell agglomerates on the surface of stainless steel plates. Polyclonal antisera produced in nine rabbits against mixtures of *P. fluorescens* strains presented different sensitivity levels, with the capacity to detect cells in concentrations which vary from  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> to  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Produced antisera have not presented cross-reaction with other contaminating bacterial species from cold raw milk, with the exception of 2A and 3A antisera which reacted with *Aeromonas*. *P. fluorescens* cells were detected at RSM 12% in  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> and  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> concentrations when drop agglutination and immunodotblot techniques were applied. These results indicate the potential of these procedures to detect these damaging bacteria at a concentration level which does not affect the quality of the milk.

## 1. INTRODUÇÃO

A modernização do modelo de produção de leite no Brasil iniciou-se nos anos 90, refletindo-se no ganho de produtividade, qualidade e maior competitividade com produtos importados. A fixação de padrões de identidade e qualidade pelo MERCOSUL, em 1992, foi um dos determinantes desse momento de necessidade premente de mudança do modelo arcaico, então vigente, para um moderno, gerador de novo perfil qualitativo de produtos, intensificação e ampliação da produção.

O resfriamento e a granelização para a manutenção da qualidade do leite iniciaram-se em 1939, em grandes fazendas na Califórnia, e, ao final da década de 50, todo o leite norte-americano era coletado a granel. Apesar disso, até hoje estudos e pesquisas buscam soluções para os problemas decorrentes dessa tecnologia. Bactérias psicrotóficas são os principais agentes implicados na deterioração de leite refrigerado. Dentre os psicrotóxicos, o gênero *Pseudomonas* é um importante agente de deterioração do leite cru, considerando que possui tempo de geração reduzido a temperaturas de refrigeração. Além disso, muitas espécies de *Pseudomonas* produzem proteases e lipases termorresistentes que contribuem, consideravelmente, para a deterioração de produtos lácteos. O abaixamento de temperatura, ainda que determine menor taxa de crescimento microbiano, não é suficiente para impedir que enzimas hidrolíticas atinjam concentrações capazes de deteriorar o leite, e, ou interferir na produção e na qualidade dos produtos derivados.

Atualmente, é reconhecido no meio científico que, no mundo bacteriano, a vida em comunidades é o usual e não exceção. Vislumbra-se, assim, o problema dos

biofilmes em indústrias de alimentos. O leite, em particular, por ser um fluido rico em nutrientes, pode se concentrar em áreas de superfície de tubulações, equipamentos e superfícies de contato e permitir o crescimento de células bacterianas aderidas a superfícies. As comunidades bacterianas aderidas à interface sólido-líquido representam potencial de contaminação celular e química do leite e podem resultar em comprometimento da saúde do consumidor e na perda de qualidade em função da ação das enzimas deterioradoras liberadas.

Constatam-se dificuldades para a determinação rápida da presença da microbiota psicrotrófica proteolítica deterioradora de leite e derivados, uma vez que o método oficial recomenda condições de incubação a 7 °C, por 7 a 10 dias, e, por meio do método alternativo, estima-se a microbiota após incubação por 25 h, a 21 °C. Esses métodos microbiológicos convencionais, além de demorados, não apresentam correlação satisfatória com o potencial de deterioração do leite e derivados. Métodos mais rápidos, precisos e sensíveis necessitam ser desenvolvidos, a fim de se detectar a microbiota psicrotrófica proteolítica presente no leite, uma vez que as metodologias disponíveis não permitem obter informação sobre a qualidade microbiológica do produto antes do seu processamento. Técnicas imunológicas apresentam potencial para aplicação na detecção de células microbianas ou seus metabólitos.

Essas considerações motivaram a pesquisa, para verificar a formação de biofilmes por bactérias isoladas de leite cru refrigerado e a atividade proteolítica nesses biofilmes. Estirpes de *Pseudomonas fluorescens* foram utilizadas como modelo, averiguando-se o potencial de desenvolvimento de biofilmes em superfície de aço inoxidável, em temperatura de refrigeração. Pesquisou-se, também, a viabilidade de detecção de células de *P. fluorescens* no leite, por métodos imunológicos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Enzimas de psicotróficos em leite**

A perda de qualidade do leite se expressa na alteração de seu sabor e de características físico-químicas. Enzimas são os principais fatores determinantes dessas alterações e tanto podem ser endógenas, quanto produzidas por bactérias contaminantes. Poucas enzimas endógenas afetam a qualidade e o tempo de vida de prateleira do leite e de seus derivados e as enzimas bacterianas são apontadas como as principais responsáveis por essas alterações (GUINOT-THOMAS et al., 1995; MUIR, 1996a; CHEN et al., 2003). Particularmente importantes, são as enzimas termorresistentes produzidas por bactérias psicotróficas em leite cru antes do processamento térmico, ou enzimas e outros metabólitos de psicotróficos produzidos durante o armazenamento de leite e derivados sob refrigeração. Essas enzimas hidrolisam a  $\kappa$ -caseína, mas algumas têm preferência por  $\alpha$ -S1 e  $\beta$ -caseína, sendo que nenhum sítio de clivagem específico foi ainda encontrado (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

Considerando que as enzimas produzidas por bactérias psicotróficas são responsáveis por defeitos de qualidade do leite e derivados, a atividade desses organismos no leite precisa ser controlada, para assegurar a qualidade dos produtos lácteos. Como a temperatura de refrigeração adotada no armazenamento do leite não inibe o crescimento de psicotróficos nem a produção e atividade de enzimas deterioradoras, é imprescindível que se assegure a adoção das boas práticas de produção (BPP) para limitar a contaminação microbiana. Uma alternativa, para minimizar os

danos causados por essa microbiota, é o controle do tempo de estocagem do leite cru, considerando que o processo de resfriamento e armazenamento do leite por longos períodos favorece o estabelecimento de uma microbiota psicotrófica (ADAMS et al., 1976; CHEN et al., 2003). Para URAZ e CITAK (1998), o tempo de estocagem do leite cru não deve ser superior a 24 h, após o recebimento pela indústria de laticínios.

Enzimas que hidrolisam ligações peptídicas são denominadas proteases, proteinases, peptidases e enzimas proteolíticas (CHEN et al., 2003). Proteases são divididas em dois amplos grupos principais, as exopeptidases e as endopeptidases, dependendo do sítio de ação (RAO et al., 1998). As proteases são enzimas que atuam internamente na cadeia de polipeptídios e, em função do mecanismo de ação, são classificadas nos subgrupos serina, cisteína, ácido aspártico e metaloproteases (CHEN et al., 2003). Na vasta literatura relativa a enzimas bacterianas hidrolíticas em leite, são encontradas as denominações protease e proteinase. No presente trabalho, protease é usada referindo-se a enzimas com atividade proteolítica, independente da denominação aplicada pelos pesquisadores citados.

A granelização e a refrigeração do leite, estabelecidas pelo Programa Nacional de Melhoria da Qualidade de Leite – PNQL, promovem a mudança dos agentes de deterioração e, em vez de ácidos produzidos pela ação de mesófilos, as enzimas proteolíticas e lipolíticas de psicotróficos tornaram-se as principais responsáveis pela perda da qualidade do leite e seus derivados. A Resolução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002) estabelece que o leite deve ser refrigerado a 4 °C ou menos, até três horas após a ordenha, e mantido à temperatura de conservação de 7 °C na propriedade rural ou no tanque comunitário; e a 10 °C no estabelecimento processador. A Instrução Normativa nº 51 do mesmo ministério estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento que vai beneficiá-lo deve ser, no máximo, de 48 h, independente do seu tipo, e recomenda, como ideal, um período de tempo não superior a 24 h.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* predominam entre psicotróficos proteolíticos deterioradores do leite cru (ADAMS et al., 1976; EWINGS et al., 1984; PINTO, 2004). Em produtos lácteos refrigerados, *P. fluorescens* é a espécie mais comumente encontrada (COUSIN, 1982; McKELLAR, 1986; RAJMOHAN et al., 2002; PINTO, 2004) e está com maior frequência associada a defeitos sensoriais, embora outras espécies, como *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* também sejam comumente encontradas (WIEDMANN et al., 2000; DOGAN e BOOR,

2003). O crescimento dessas bactérias no leite cru, associado à produção de enzimas proteolíticas termorresistentes é responsável pela gelatinização, ou perda de sabor em leite pasteurizado ou esterilizado - UAT (COUSIN, 1982; RAJMOHAN et al., 2002). Segundo COUSIN (1982), *Pseudomonas* representam apenas 10% da microbiota inicial presente em leite fresco. No entanto, possuem alta taxa de crescimento em temperaturas baixas (CHESSA et al., 2000), o que explica a sua predominância em produtos armazenados sob refrigeração.

O crescimento de espécies de *Pseudomonas* psicrotroficas em leite cru predispõe suas proteínas aos efeitos deletérios do tratamento UAT, como demonstrado por ADAMS et al. (1976).

As espécies de *Pseudomonas* variam em sua capacidade de produzir enzimas como proteases, lipases e lecitinasas, associadas à deterioração do leite (WIEDMANN et al., 2000; DOGAN e BOOR, 2003; PINTO, 2004). Algumas dessas proteases são produzidas em meio basal por diferentes espécies de *Pseudomonas* e, conseqüentemente, são consideradas constitutivas (McKELLAR, 1986; FAIRBAIRN e LAW, 1986). Segundo RAJMOHAN et al. (2002), não há consistência entre as concentrações de nutrientes disponíveis e de proteases produzidas. Durante o desenvolvimento de *P. fluorescens* M.S 31, a 20 °C, em meio de peptona tamponado, a detecção máxima de protease ocorreu no final da fase logarítmica de crescimento e permaneceu durante a fase estacionária. Em meio mínimo salino, a atividade de proteases foi detectada ao final da fase logarítmica de crescimento e em concentrações semelhantes às obtidas nos cultivos em concentrações diferentes de peptona.

Há diferenças fundamentais no perfil funcional de proteases extracelulares produzidas pelas diferentes estirpes de *P. fluorescens* (McKELLAR, 1986), tais como termosensibilidade (GRIFFITHS et al., 1981); especificidade de substratos (ADAMS et al., 1976) e massa molecular (RAJMOHAN et al., 2002). As proteases de *Pseudomonas* foram ativas em uma ampla faixa de temperatura testada por KOHLMANN et al. (1991), correspondendo de 7 °C a 52 °C, sendo o ótimo entre 37 °C e 40 °C para protease de *P. fragi* e *P. fluorescens*, respectivamente, e, de forma genérica, de 30 °C a 45 °C (FAIRBAIRN e LAW, 1986). Além disso, essas enzimas possuem baixa energia de ativação e são mais ativas entre 4 °C e 7 °C do que as enzimas de mesófilos (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997), ou seja, proteases de *Pseudomonas* são bem adaptadas para organismos de crescimento a baixas temperaturas (FAIRBAIRN e LAW, 1986).

Quantidades elevadas de proteases são produzidas mesmo a temperaturas próximas a 5 °C, e a síntese é induzida por vários peptídeos de baixa massa molecular, provenientes da degradação de proteínas. A produção de proteases é favorecida a 20 °C mais do que a 5 °C, 10 °C ou 30 °C (RAJMOHAN et al., 2002) e a 21 °C, mais que 37 °C, 32 °C ou, 10 °C (MAYERHOFER et al., 1973). O efeito de temperatura sobre a produção de enzimas é específico para cada estirpe, segundo conclusões de GRIFFITHS (1989).

A termorresistência de proteases de psicrotróficos, em especial de *Pseudomonas*, é altamente diversa (GRIFFITHS et al., 1981; FAIRBAIRN e LAW, 1986) e influenciada por vários fatores como a composição molecular. Em várias proteases, a ausência de cisteína e a interação de cátions divalentes permitem a recuperação rápida e precisa de sua forma molecular funcional. Exigência de cálcio, ausência de grupamentos sulfidrílicos, massa molecular, alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  são características da protease de *Pseudomonas* MC60 que a tornam similar à termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus* (FAIRBAIRNE e LAW, 1986). Essas características tornam a molécula de enzima flexível. Ao ser desnaturada pela alta temperatura, pode retornar à forma molecular anterior, através de pontes de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando ocorre o abaixamento da temperatura (BARACH e ADAMS, 1977). O próprio leite potencializa a termorresistência de proteases de psicrotróficos (MAYERHOFER et al., 1973; GRIFFITHS et al., 1981), provavelmente, em função da presença de íons divalentes (FAIRBAIRN e LAW, 1986).

Não há uma caracterização ampla e exata das enzimas microbianas que ocorrem em leite e, conseqüentemente, torna-se difícil determinar procedimentos adequados de inativação, que possibilitem o aumento de vida de prateleira de leite e derivados. Há vários estudos comparativos de efeitos de binômios arbitrários, tempo-temperatura sobre proteases, que dificultam comparação. O valor D de termorresistência seria um parâmetro efetivo de comparação, mas há poucos dados com esse fundamento. Algumas proteases de psicrotróficos parecem ser susceptíveis de inativação a 55 °C, uma temperatura relativamente baixa que teria pouco efeito sobre qualidade do leite e derivados (FAIRBAIRN e LAW, 1986). No entanto, GRIFFITHS et al. (1981) demonstraram que o grau de inativação de proteases parcialmente purificadas, pelo aquecimento a 55 °C, durante uma hora, é altamente variável, mesmo entre estirpes de uma mesma espécie. Esses autores determinaram ainda que as proteases purificadas são menos termoestáveis que as presentes em sobrenadantes de meios de culturas.

Combinações de tratamentos térmicos como, por exemplo, 77 °C, por 17 segundos, seguindo-se de 55 °C durante uma hora, têm menor efeito sobre a termorresistência de proteases de *Pseudomonas* e outros psicrotóxicos que o tratamento de 140 °C, durante 5 segundos, adotado para processamento de leite (GRIFFITHS et al., 1981).

## 2.2. Biofilmes

Além da presença de bactérias enquanto células enzimaticamente ativas, o processamento industrial de fluidos é intensamente prejudicado pela presença de biofilmes. Estes determinam perdas econômicas, direta ou indiretamente, pela formação de obstruções mecânicas, redução da eficiência na troca de calor, biodeterioração de equipamentos e pela contaminação e conseqüente deterioração de produtos, representando, também, risco à saúde pública (MITTELMAN, 1998). A formação de biofilmes ocorre em superfícies sólidas em contato com diferentes líquidos, seja água, óleo, leite, ou outros (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994) e interface de líquido-ar (O'TOOLE e KOLTER, 1998a; JENKINSON e LAPPIN-SCOTT, 2001), em interface sólido-ar, como em superfície de meios de cultura contendo ágar (BRANDA et al., 2005).

A ocorrência de biofilmes é ubíqua e constitui uma estratégia de sobrevivência bacteriana que se adere a superfícies contendo nutrientes disponíveis, em ambientes oligotróficos (COSTERTON et al., 1995). A ligação a superfícies sólidas é vantajosa sob vários aspectos. Segundo ZOBELL (1943), nutrientes concentram-se sobre a superfície sólida que retarda a difusão de exoenzimas das bactérias, promovendo facilitação de hidrólise de substratos e disponibilidade imediata de seus subprodutos.

Bactérias em biofilmes têm maior resistência a agentes antimicrobianos. *Staphylococcus aureus* aderidos em cupons de aço inoxidável, tratados com 25 ppm de ácido peracético, apresentaram resistência, enquanto as células tratadas imediatamente após suspensão foram sensíveis (JOHNSTON e JONES, 1995). Esses resultados sugerem que não há adaptação fisiológica do microrganismo e sim proteção física da estrutura do biofilme. Alguns pesquisadores dimensionaram a maior resistência a antimicrobianos apresentada por bactérias aderidas. Há os que consideram que as células aderidas são 500 vezes (COSTERTON et al., 1995) ou 1.000 vezes (DRENKARD, 2003) mais resistentes que as células planctônicas correspondentes aos mesmos agentes antimicrobianos. Isso indica que mecanismos determinantes dessas

resistências podem diferir em células planctônicas e aderidas, e acredita-se que esses mecanismos sejam multifatoriais. Somente a combinação de diferentes mecanismos poderia determinar a intensa resistência, própria de comunidades de biofilmes (DRENKARD, 2003). Entretanto, não há uma definição dos fatores que promovem essa diferença entre células planctônicas e aderidas. A justificativa de falta de penetração do agente antimicrobiano nas camadas do biofilme não é confirmada, quando se demonstra a capacidade de penetração de esferas de látex através de canais dos biofilmes (COSTERTON et al., 1995). Em biofilmes, constata-se a presença de células aderidas com menor taxa metabólica (LE MAGREX et al., 1994), mas ocorre intensa produção enzimática nessas estruturas (SAUER et al., 2002). Há, ainda, um gradiente de atividade fisiológica em função da disponibilidade de substratos ao longo da espessura do biofilme (CHOPP et al., 2003).

De acordo com MOSTELLER e BISHOP (1993), bactérias Gram-negativas aderem-se mais facilmente às superfícies que as Gram-positivas. AUSTIN e BERGERON (1995) encontraram biofilme em planta de processamento de laticínios constituído de bastonetes Gram-negativos em sua base e recoberto por bactérias Gram-positivas. Outros fatores importantes no processo de adesão são o tipo, a forma iônica e o tamanho da partícula do material de aderência.

A relação numérica entre bactérias livres e bactérias aderidas no biofilme é função de vários fatores correlacionados, incluindo-se cargas energéticas das superfícies, materiais de construção, topografia, fatores hidráulicos e químicos de biofilmes. O número de células aderidas não aumenta na mesma proporção que as planctônicas. As explicações incluem as considerações de que a capacidade de aderência é variável, conforme a fase de crescimento celular e ocorre saturação no biofilme (HOOD e ZOTTOLA, 1997).

### **2.2.1. Formação e estrutura dos biofilmes**

Os biofilmes têm desenvolvimento cíclico na natureza (SHIRTLIFF et al., 2002) que finaliza com fase de dispersão celular no ambiente (SAUER et al., 2002). Trata-se, portanto, de uma forma de disseminação da contaminação microbiana. A fase inicial de formação de biofilmes por *P. fluorescens* WCS365 é dependente da produção de novas proteínas desnecessárias para a manutenção de células aderidas. Esta foi a conclusão de O'TOOLE e KOLTER (1998a) que utilizaram  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  de tetraciclina e inibiram a

formação de biofilmes na presença de células viáveis. Por outro lado, a aplicação dessa droga após estágio inicial de formação do biofilme não impediu seu desenvolvimento. O tratamento de células dessa estirpe de *P. fluorescens*, com a protease pronase E, determinou decréscimo do número de células aderidas apesar da equivalência da densidade de células planctônicas com a cultura não-tratada. Estes resultados sugeriram a O'TOOLE e KOLTER (1998a) que uma ou mais proteínas extracelulares tem papel na adesão à superfície. A expressão diferencial de proteínas extracelulares e sua conjugação com condições ambientais para a formação de biofilmes foi também considerada por BRANDA et al. (2005).

A adesão de bactérias a superfícies desencadeia a expressão de fatores sigmas repressores de diversos genes, determinando diferenças fenotípicas entre células planctônicas e aderidas (COSTERTON et al., 1995). Entretanto, a intensa integração microbiana que ocorre nos biofilmes não é ainda totalmente conhecida, no que se refere aos mecanismos efetores de sinais e respostas às mudanças genéticas e ao controle nas células crescendo aderidas a superfícies. Sabe-se que há intensas alterações transcricionais, a exemplo de *Escherichia coli* que tem 38% de seus genes afetados (JENKINSON e LAPPIN-SCOTT, 2001). O crescimento de *P. aeruginosa* em biofilmes e a estruturação destes são influenciados pelo circuito regulatório *quorum sensing* (DAVIES et al., 1998; SAUER et al., 2002), determinando uma expressão dinâmica de genes nessa estrutura (BOLLINGER et al., 2001). Por meio do processo *quorum sensing*, diversas bactérias monitoram a densidade de sua população e modulam a expressão de seus genes adequadamente, via moléculas extracelulares sinalizadoras. Há diversos mecanismos de funcionamento do *quorum sensing*. Atualmente, o mais conhecido e mais bem caracterizado é aquele com base em moléculas de acil homoserina lactonas (AHLs) (CHOPP et al., 2003). Em *P. aeruginosas*, AHLs são as moléculas sinalizadoras envolvidas na formação de biofilmes (SAUER et al., 2002) assim como em *P. fluorescens* B52 (ALLISON et al., 1998). *Escherichia coli* não produz AHLs, mas tem receptores correlatos e pode, assim, receber moléculas sinalizadoras de outras bactérias (VAN HOUTT e MICHIELS, 2005) que podem influenciar na formação de biofilmes. Sabe-se que o sistema *quorum sensing* não atua no início da formação do biofilme, mas sua influência foi evidenciada a partir dos estádios de adesão irreversível em *P. aeruginosa* (SAUER et al., 2002). Há uma conexão entre densidade celular e produção de polissacarídeos extracelulares, porém

não está elucidado o mecanismo molecular dessa conexão, que determina a arquitetura do biofilme em *P. aeruginosa* (BRANDA et al., 2005).

A diferenciação do perfil protéico qualitativo e quantitativo é uma expressão da atuação do sistema *quorum sensing* em todos os cinco estádios do desenvolvimento de biofilmes celulares (SAUER et al., 2002) e na formação de agregados celulares (DAVIES et al., 1998). A dispersão de células do biofilme, entretanto, não parece ser controlada por AHLs, e sim por enzima (ALLISON et al., 1998). SAUER et al. (2002) desenvolveram um estudo detalhado sobre modificações de perfil qualitativo e quantitativo de proteínas em cada fase de desenvolvimento dos biofilmes, com amostras de *P. aeruginosa*. As mudanças na regulação de proteínas em cada estágio foram tão profundas quanto as diferenças entre espécies, nas mesmas fases. No estágio de maturação, ocorreram algumas proteínas super-reguladas implicadas em processos anaeróbios (SAUER et al., 2002). Ficou demonstrado que o padrão de proteínas na fase de dispersão de biofilmes está intimamente relacionado com o padrão de bactérias planctônicas. A transição para a fase de dispersão é o único momento em que há mais proteínas com produção sub- do que super-reguladas. Isto pode significar que a produção de proteínas é maior pelas bactérias em biofilmes do que pelas planctônicas. Esses achados extrapolados para biofilmes em tanques de expansão e em silos industriais de armazenamento de leite tornam os biofilmes e essas enzimas mais preocupantes para as indústrias de laticínios. Não existem dados na literatura que comprovem essa hipótese. SAUER et al. (2002) consideraram que conhecimentos dessas peculiaridades da fisiologia serão importantes na detecção e no controle de biofilmes. Para STOODLEY et al. (2002), provavelmente, existem alguns regulons de biofilmes ainda desconhecidos. Há também falta de informações relativas à interferência de temperaturas de refrigeração sobre a formação de biofilmes, assim como relativas ao potencial de liberação enzimático dessa estrutura no leite.

Os biofilmes são estruturas tridimensionais, com canais e múltiplas camadas de células microbianas envolvidas em polímeros extracelulares e de composição complexa, mas estável, graças a matrix polissacarídica, presença de água,  $Ca^{2+}$  e proteínas (JENKINSON e LAPPIN-SCOTT, 2001). Eles são tão diversos quanto seus constituintes microbianos, variando também quanto às condições ambientais (BRANDA et al., 2005). A matrix extracelular é o constituinte comum e crítico para integridade de todos os biofilmes. Análises genéticas demonstraram que polissacarídeos extracelulares têm papel importante na determinação da arquitetura de biofilmes de diferentes espécies

bacterianas (BRANDA et al., 2005). Atualmente, é conhecido que há grande diversidade na composição de polissacarídeos de biofilmes entre as espécies bacterianas.

Os biofilmes caracterizam-se pela grande densidade celular e arquitetura altamente ordenada com estrutura em cogumelo e tipo pilar. O arranjo regular de canais e agregados celulares fornece uma rota de transporte de oxigênio e nutrientes para a base do biofilme, sem necessitar de difusão no sentido vertical (COSTERTON et al., 1995). Esses detalhes da arquitetura do biofilme eram desconhecidos até o final de 1987, quando se questionava como células embebidas randomicamente em matrix teriam acesso a nutrientes (STOODLEY et al., 2002). As primeiras imagens em microscopia confocal a laser (SCLM) foram importantes para elucidar esta questão (LAWRENCE et al., 1991).

A arquitetura dos biofilmes é diferenciada entre espécies bacterianas. *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* que apresentam densidade celular maior em região mais próxima a interface líquido-sólido que no ápice do biofilme, enquanto *Vibrio parahaemolyticus* desenvolve biofilmes em forma piramidal invertida. A visualização de biofilmes maduros dessas três espécies em SCLM indicou uma distribuição contínua, sem individualização de microcolônias (LAWRENCE et al., 1991).

Além de fatores como motilidade, taxa de crescimento, sensores e moléculas sinalizadoras, fatores físicos ambientais podem atuar na determinação da estrutura do biofilme. Em culturas usuais sob fluxo contínuo médio, formam-se microcolônias em forma de coluna e em forma de cogumelo, sem evidência de direcionamento e, em fluxo alto unidirecional, formam-se aglomerados alongados (STOODLEY et al., 2002). DUDDRIDGE et al. (1982) observaram que um maior número de bactérias aderidas foi obtido na periferia das placas teste correspondentes à superfície com fluxo mais brando. O fluxo pode influenciar também a espessura e a densidade do biofilme (STOODLEY et al., 2002). Esses autores consideraram que a biomecânica de biofilmes é um fator importante na estrutura de ligação e pode ajudar a responder ao questionamento se biofilmes são entidades coordenadas que determinam sua estrutura de forma ativa, ou se são meros agregados celulares que passivamente são formados em função das condições físicas e químicas do ambiente.

### **2.2.2. Sistemas para estudos dos biofilmes**

Diferentes sistemas têm sido utilizados em laboratórios, para produção e testes em biofilmes. Vários pesquisadores utilizaram sistemas de batelada estáticos ou em agitação, para cultivo de biofilmes em interface sólido-líquido, submersa (JEONG e FRANK, 1994; HOOD e ZOTTOLA, 1997; ANDRADE et al., 1998a e b; ROSSONI e GAYLARDE, 2000; JOSEPH et al., 2001). Sistemas contínuos também são utilizados e são indicados em função da possibilidade de controle de composição de meio de cultura e disponibilidade de nutrientes e de outros fatores (SAUER et al., 2002). Os biofilmes formados em interface ar-líquido são cultivados em placas de microtitulação nas quais são rapidamente produzidos grandes números dessa estrutura (BRANDA et al., 2005). Há ainda aqueles sistemas desenvolvidos especialmente para cultivo de biofilmes em superfícies sólidas. O sistema de Robins é considerado o mais conhecido deles. Pode ser utilizado em pesquisas de diferentes aplicações, seja no efeito corrosivo de biofilmes em sistemas de tratamento de água, ou óleo, em patogenia bacteriana e podem ser adaptados fluxos de alta e baixa pressão (KHARAZMI et al., 1999). Outro procedimento para a obtenção de biofilmes em laboratório é pelo uso de reatores. Resultados precisos e reprodutíveis foram obtidos em pesquisas que utilizaram esse sistema, conforme demonstrado por GOERES et al. (2005). Todas essas modalidades de sistemas permitem a remoção de cupons, individualmente, para realização das análises desejadas.

Na formação de biofilmes em sistema sólido-líquido em laboratórios, superfícies como polivinil cloreto-PVC (O'TOOLE e KOLTER, 1998a e b), polipropileno e teflon (GOERES et al., 2005), vidro (ALLISON et al., 1998) e aço inoxidável (WIRTANEN et al., 1996; ANDRADE et al., 1998a e b; ROSSONI e GAYLARDE, 2000; BOLLINGER et al., 2001) são alguns exemplos de materiais utilizados. O aço inoxidável tipo 304 acabamento # 4, por ser o mais indicado para superfícies de contato com alimentos, é o mais empregado em pesquisas na área de alimentos.

A observação de biofilmes pode ser feita por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Embora seja utilizada para visualizar biofilmes, a aplicação do microscópio eletrônico de varredura (SEM) é questionada (NICKEL et al., 1985). O preparo de biofilmes para exame em microscópio eletrônico envolve desidratação, podendo induzir alterações morfológicas, incluindo-se aí retração e rompimento de estruturas (LAWRENCE et al., 1991).

A microscopia de escaneamento confocal a laser (CSLM) iniciou uma nova era no estudo de biofilmes (STOODLEY et al., 2002), pois permitiu a visualização e a análise de biofilmes íntegros, totalmente hidratados (LAWRENCE et al., 1991; BEYENAL et al., 2004). Essa técnica oferece grandes vantagens e, entre elas, a de não ser invasiva ao biofilme e ser de alta resolução (200 nm), com imagens totalmente em foco, sem névoa, tornando-as receptivas, para análise ao computador. Permite visualização em profundidade de campo, com imagens de limites de células bem definidas, possibilitando determinação de seus números e definição de área de material não celular. O corte sagital do biofilme permite a visualização de células e sua associação com o suporte de aderência, de um ponto de convergência das direções X e Z no interior do biofilme. Em CSLM, é possível acompanhar o desenvolvimento de microcolônias (LAWRENCE et al., 1991). Imagens registradas em vários planos do biofilme, associadas a cálculos de volume, áreas de superfície, distribuição de espessura, volumes de microcolonias, distribuição de distância de difusão, relação de superfície e taxa de volume de imagem tridimensional da massa do biofilme, promoveram a definição da arquitetura de biofilmes. BEYENAL et al. (2004) propuseram a automação de cálculos, promovendo melhoria de metodologias anteriormente adotadas, as quais utilizavam cálculos manuais.

A quantificação de células presentes nos biofilmes pode ser necessária para informar o significado dessa estrutura em situações específicas. Na indústria de alimentos, por exemplo, os biofilmes podem interferir na eficiência de trocadores de calor e constituir-se em fonte de contaminação por patógenos ou deterioradores. A determinação do número de bactérias nessas estruturas é uma expressão indireta de quantidade de biofilme e direta do potencial representado pelas bactérias presentes. Há poucas técnicas disponíveis para realizar a medida de adesão bacteriana e poucas pesquisas que comparam a eficácia e a validade desses procedimentos (VESTERLUND et al., 2005). A quantificação de células em biofilmes requer a extração e a homogeneização do material aderido na superfície sólida experimentada e sua suspensão em meio líquido adequado. Não tem sido indicada, ainda, uma metodologia ideal para a extração de células do biofilme. Os procedimentos incluem imersão dos cupons em solução de peptona a 0,1% e agitação em agitador de tubos tipo vórtex (ANDRADE et al., 1998a), raspagem dos cupons e posterior enxágüe e homogeneização em meio líquido adequado (JEONG e FRANK, 1994; GOERES et al., 2005), retirada do material aderido com auxílio de *swab* e posterior imersão em líquido

diluyente (WIRTANEN et al., 1996; JOSEPH et al., 2001) ou sonicação (WHITELEY et al., 1997; GOERES et al., 2005).

A quantificação das células extraídas dos cupons faz-se por espalhamento da suspensão em superfície de ágar ou pelo uso da técnica de microgotas e posterior contagem de colônias (WIRTANEN et al., 1996; ANDRADE et al., 1998a; JOSEPH et al., 2001; GOERES et al., 2005). A microscopia de epifluorescência tem sido utilizada com frequência, para visualização de células aderidas (SAUER et al., 2002) e quantificação das mesmas (WIRTANEN et al., 1996; HOOD e ZOTTOLA, 1997; ANDRADE et al., 1998a; ROSSONI e GAYLARDE, 2000). A contagem de células ao microscópio é laboriosa e exige coloração e contagem de vários campos, sendo um procedimento sujeito a diversos erros. A contagem de colônias em placas e a contagem de células ao microscópio não constituem metodologias adequadas, quando a população microbiana for mista (VESTERLUND et al., 2005) e a distinção entre os microrganismos for um dado essencial ao experimento. O'TOOLE e KOLTER (1998a) detectaram, de maneira indireta, a formação de biofilmes em placas de PVC de microtitulação, impregnando as células em biofilmes com cristal violeta. A intensidade da cor foi avaliada por meio de leitura direta do material na própria placa de crescimento em comprimento de onda de 600 nm ou, após extração do corante com etanol, a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. LOUKILI et al. (2004) utilizaram cristal violeta para corar biofilmes de *E. coli* em paredes de tubos de hemólise. O objetivo era testar a eficácia de detergentes e desinfetantes por meio da detecção de células viáveis nos biofilmes. Os resultados obtidos caracterizaram o método como reprodutivo, sendo considerado adequado ao auxílio de escolha de detergente ou desinfetante. A quantificação de células diretamente nos biofilmes pode ser feita também por impedância (JOHNSTON e JONES, 1995; ANDRADE et al., 1998b), que consiste na resistência ao fluxo de uma corrente alternada, passada através de um material condutor. O crescimento de células de microrganismos no meio de cultura é avaliado por meio da condução automática, contínua e medida simultânea de componentes de impedância entre dois eletrodos imersos no meio. Trata-se de método mais sensível que o plaqueamento de suspensões de material extraído com posterior contagem de colônias. Essa técnica detecta células reversível e irreversivelmente aderidas à superfície (MOSTELLER e BISHOP, 1993) e tem capacidade de detectar uma única célula na superfície (JOHNSTON e JONES, 1995). JOHNSTON e JONES (1995) consideraram que é apenas preferível quantificar

células em biofilmes íntegros que em material extraído, e constataram pequena diferença entre contagem de células por plaqueamento e impedância em experimentos com *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. Medidas de radioatividade em células de *Salmonella enterica* e de *E. coli*, aderidas a muco intestinal que recobre superfície de placa de microtitulação, foi a técnica mais sensível e reprodutiva, quando comparada com técnicas de detecção de fluorescência em proteínas celulares e de coloração com cristal de violeta (VESTERLUND et al., 2005).

A literatura pesquisada mostra que, atualmente, há conhecimento vasto e detalhado referente à formação e ao desenvolvimento de biofilmes. No entanto, é evidente a dificuldade de sua eliminação absoluta, demonstrando-se, assim, o potencial contaminante dessas estruturas para os produtos pós-processados (DUDDRIDGE et al., 1982; AUSTIN e BERGERON, 1995; MITTELMAN, 1998; SHARMA e ANAND, 2002 a e b). A presença de microbiota após os procedimentos de limpeza -CIP e sanificação em plantas de processamento de leite (SHARMA e ANAND, 2002 a e b) confirmam o fato de que mesmo com procedimentos CIP aceitáveis, as bactérias permanecem em superfícies de equipamento (AUSTIN e BERGERON, 1995; MITTELMAN, 1998).

O estudo de linhas de processamento de leite não inclui tanques de expansão, local onde o leite cru permanece pelo menos 48 h em agitação branda. O leite em tanque de expansão apresenta uma série de condições favoráveis à formação e ao desenvolvimento de biofilme, como, por exemplo, microbiota mista, incluindo bactérias Gram-negativas; superfície de aço inoxidável, já demonstrada ser suporte de adesão bacteriana, e a agitação, apenas branda, da massa líquida. Segundo MITTELMAN (1998), o filme condicionador de superfície correspondente a proteínas, formado no primeiro estágio de desenvolvimento de biofilme, deposita-se após 5 a 10 segundos de imersão de uma superfície lisa em um meio fluido e, em leite, esse filme corresponde a proteínas desse fluido. SUÁREZ et al. (1992) demonstraram que o leite inibiu a adesão de bactérias psicrotróficas e com mais intensidade que aquelas que eram fortemente aderentes. Esses pesquisadores afirmaram que a aderência intrínseca de bactérias não precisa ser considerada fator relevante na contaminação de equipamento de laticínios. AUSTIN e BERGERON (1995) detectaram setores ao longo da linha de processamento do leite, nos quais havia depósitos de material orgânico, mas não havia bactéria aderida, ou seja, sem formação de biofilmes, após quatro semanas.

Independente da ocorrência de adesão em tanques de expansão, *Pseudomonas*, particularmente a espécie *P. fluorescens*, afeta a qualidade do leite e de derivados, por produzir enzimas hidrolíticas termoestáveis. A detecção dessa bactéria em fases precoces do processamento de leite e derivados direciona a tomada de decisões preventivas de seus efeitos deterioradores.

### **2.3. Métodos de determinação de microbiota psicotrófica contaminante do leite**

Dados da literatura demonstram que ainda não existe um método ideal para o monitoramento da microbiota de leite cru que promova uma previsão de tempo de vida de prateleira. Os métodos existentes baseiam-se em contagem direta ao microscópio, determinação do Número Mais Provável (NMP) e contagem padrão em placas, além de determinação indireta, que se baseiam na redução de corantes (AHMAD e JINDAL, 2006). Esses métodos são limitados pelo tempo de obtenção de resultados, que não é compatível com os requerimentos para atender a um controle de qualidade eficiente na indústria de laticínios (GARDEA et al., 2002). Uma variação da técnica convencional de contagem padrão de psicotróficos foi estabelecida pela Federação Internacional de Laticínios (IDF, 1991), e preconiza a incubação por 25 h, a 21 °C. Esses métodos que utilizam incubação preliminar das amostras de leite antes do plaqueamento e da incubação, geralmente, são finalizados após 24 h (BISHOP e WHITE, 1989; WHITE, 1993). As desvantagens dessas metodologias, convencional e estimativa, são a inviabilidade do direcionamento do leite, em tempo hábil, para o processamento e a ausência de relação entre as populações de microrganismos psicotróficos e a atividade proteolítica (COUSIN, 1982). Por isso, os procedimentos de plaqueamento, precedidos ou não de incubação preliminar, têm baixa correlação com a vida útil real dos produtos lácteos (WHITE, 1993). Os resultados obtidos por DUYVESTYEN et al. (2001) permitiram concluir que a contagem padrão em placas não é uma opção válida para a determinação da qualidade sensorial do leite pasteurizado. Esses autores constataram uma correlação muito baixa entre a contagem de psicotróficos aeróbios e avaliação sensorial do produto. Portanto, as desvantagens associadas à técnica de contagem padrão em placas comprometem uma característica desejável para a garantia de qualidade na indústria de laticínios, que é a capacidade de prever rapidamente a vida-de-prateleira dos seus produtos finais.

Peculiaridades fisiológicas dos psicrotróficos e as limitações de procedimentos para mensuração e monitoramento de seus efeitos sobre a constituição do leite, de forma preventiva, dificultam uma definição de tecnologia adequada a este fim. Os efeitos deletérios de enzimas bacterianas sobre o leite somente são mensuráveis, quando a densidade celular é suficiente para produzir enzimas ativas em concentração capaz de provocar defeitos no leite ou derivados (MUIR, 1996a). Em geral, a deterioração de leite cru pela lipólise não ocorre até que a contagem de células ultrapasse  $5,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Por outro lado, segundo ADAMS et al. (1976), a proteólise detectável em leite independe do número elevado de células de psicrotróficos. A contagem de células não correlaciona diretamente com o grau de proteólise de caseína em leite estocado a 4 °C (PICARD et al., 1994) e não há correlação também com proteases (JUFFS, 1973; HARYANI et al., 2003). Uma alta concentração de células psicrotróficas em leite cru não significa, necessariamente, maior atividade de protease do que em leite com baixa concentração celular. É importante que, especificamente, a população produtora de proteases termorresistentes permaneça em número mínimo no leite cru (HARYANI et al., 2003). Apesar das vantagens da refrigeração para armazenamento do leite, sua eficácia deve ser monitorada.

A atividade de proteases em leite pode ser medida por meio da determinação da concentração de aminoácidos ácido-solúveis e de peptídeos, ou aminogrupos livres. O método descrito por HULL (1947), utilizado por alguns pesquisadores (MAYERHOFER et al., 1973; ADAMS et al., 1975), e o índice de tirosina (JUFFS, 1973) quantificam fragmentos de proteínas ácido-solúveis utilizando reagente de Folin. HUMBERT et al. (1990) propuseram dosagem de aminogrupos resultantes da proteólise em leite, utilizando solvente que dispensa precipitação e filtração do leite, necessárias antes da leitura em espectrofotômetro, para eliminar a opacidade. Esses autores consideraram o método rápido e mais fácil para aplicação em indústria de laticínios, oferecendo também a vantagem de leitura em espectro visível (420 nm).

Outra alternativa é a determinação do efeito da suspensão de leite sobre substratos específicos (atividade de proteases) que, quando hidrolisados, liberam produtos coloridos, quantificados por densidade ótica. A azocaseína é utilizada com mais frequência (EWINGS et al., 1984; SACHERER et al., 1994; RAJMOHAN et al., 2002). Segundo BENDICHO et al. (2002), a azocaseína é um dos melhores substratos. Estes autores demonstraram a possibilidade de sua utilização em dosagens de atividade

de proteases em leite e outros diferentes meios de cultura. A hidrólise da caseína e outras proteínas também pode ser verificada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) que não é muito eficiente por não ser resolutiva para aminoácido de baixo peso molecular. LOPES-FANDIÑO et al. (1993) propuseram a aplicação de HPLC reversa, para caracterizar hidrólise em leite UAT e consideraram esse método eficiente para indicar o risco de deterioração do produto estocado.

O significado de resultados dos diversos métodos pode ser diferente, servindo a aplicações específicas, para caracterização do leite em estudo. A concentração de aminoácidos no meio é um reflexo de consumo metabólico pelos microrganismos presentes e de resultado de proteólise (JUFFS, 1973). Sua dosagem pode não informar, com exatidão, a concentração resultante da proteólise, ou seja, pode não se correlacionar com a densidade celular de bactérias proteolíticas presentes no meio.

Em razão da natureza específica e da sensibilidade elevada da reação antígeno anticorpo, técnicas imunoquímicas têm aplicação potencial para as análises rotineiras de alimentos (CANDLISH, 1991). O desenvolvimento de um método imunológico ocorre em, no mínimo, quatro etapas que envolvem a preparação do antígeno, a produção e o preparo do anticorpo, o desenvolvimento de um método adequado de análise e validação da imunoanálise, em relação a amostras de alimentos contaminadas, tanto naturalmente quanto artificialmente.

Antígenos são definidos como substâncias que irão reagir com um anticorpo específico e podem ser constituídos de moléculas de massa molecular baixa que geralmente não estimulam o sistema imune, mas que o fazem quando associados a carreadores de maior massa molecular, como proteínas. O outro tipo de antígeno, que induz resposta imunogênica e antigênica, quando injetado diretamente em animais, é constituído de moléculas como proteínas ou células microbianas intactas. Segundo CANDLISH (1991), os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Os monoclonais são moléculas de imunoglobulinas secretadas por células híbridas formadas pela fusão de células de tumor com células de preplasma, e sua obtenção é demorada. Anticorpos policlonais constituem uma mistura de moléculas de anticorpos contra vários epítomos e, geralmente, são simples de serem preparados e requerem técnicas menos específicas e menos tempo para o preparo do que anticorpos monoclonais.

Os anti-soros contendo anticorpos, obtidos de sangue coletado após a imunização de animais com antígenos apropriados, são usados para o desenvolvimento

de imunoanálises. Na tentativa de estabelecer metodologia de resultados rápidos, precisos e amplos, para caracterizar qualidade de leite cru refrigerado e previsão de seu tempo de vida de prateleira, vários trabalhos de produção de anti-soro contra proteases de psicrotróficos em alimentos têm sido desenvolvidos (AZCONA et al., 1989; PUNJ e MATTA, 1995; MATTA et al., 1997; MATTA e PUNJ, 2000).

Os anti-soros produzidos podem ser usados em diferentes métodos imunanalíticos para detectar células microbianas ou contaminantes, como proteínas ou toxinas em alimentos. O método de aglutinação é um deles e é usado para detectar células íntegras pela mistura de um anti-soro específico a uma suspensão de células em concentração aproximada de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> (CANDLISH, 1991). A ligação dos antígenos na superfície da célula bacteriana forma uma rede de ligações que resulta em um precipitado detectado visualmente. Este teste é, entretanto, extremamente insensível e não-específico, exige culturas puras com uma população elevada de células e, freqüentemente, resulta em reações cruzadas com outros microrganismos (CANDLISH, 1991).

Outra técnica imunológica usada é a imunodifusão dupla (IDD). Esta técnica é baseada na migração de antígeno e de anticorpo aplicados em orifícios feitos na camada de gel, distantes entre si a 0,5 cm. Ocorre difusão de Ag e Ac e reação entre eles, formando-se um precipitado, quando há concentrações equimolares desses dois elementos. A grande vantagem da IDD é permitir a comparação simultânea de muitos sistemas antigênicos contra um mesmo sistema de anticorpos, formando padrões que indicam a existência, ou não, de determinantes comuns ou diferentes, nos sistemas comparados (MEZENCIO, 1981).

Uma das técnicas mais exploradas, para a detecção de microrganismos, ou compostos produzidos por eles em alimentos, é a *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA. Essa técnica se baseia na ligação do antígeno, ou do anticorpo a uma enzima, por exemplo a peroxidase, que reage com o substrato específico, o peróxido de hidrogênio, formando um complexo que, na presença de um revelador, forma um polímero altamente insolúvel e intensamente colorido que é medido por espectrofotometria. Outras técnicas imunológicas usadas nas análises de alimentos incluem imunodot-blot, radioimunoanálise, cromatografia de afinidade, entre outras.

Ao longo dos últimos anos, as técnicas imunológicas, a exemplo da técnica ELISA, vêm sendo estudadas para a detecção e quantificação de proteases produzidas

por bactérias psicrotróficas em leite e seus derivados. BIRKELAND et al. (1985) utilizaram a técnica ELISA para a pesquisa de proteases de bactérias psicrotróficas em leite desnatado. A sensibilidade alcançada foi de 0,25 ng mL<sup>-1</sup>, e a protease foi detectada, quando o número de células de *P. fluorescens* P1 na amostra, atingiu 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. A diluição das amostras em água permitiu a detecção das proteases, quando a densidade populacional era 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. MATTA et al. (1997) também detectaram o correspondente a 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de células de *Pseudomonas* presentes na amostra de leite, por ELISA, mas consideraram essa análise de aplicação limitada, para realização em condições de rotina industrial.

O dot-ELISA foi sugerido como método mais simples, rápido e prático, para a detecção de protease em leite (MATTA et al., 1997). Visando ampliar a sensibilidade da técnica, MATTA e PUNJ (2000) obtiveram um anti-soro contra uma mistura de proteases de *Bacillus*. Todos os resultados sugeriram a adequação das metodologias, para a detecção de proteases microbianas de psicrotróficos em leite. No entanto, a precisão e a sensibilidade obtidas não foram suficientes para representarem métodos preditivos de qualidade de leite. MATTA et al. (1997) detectaram 1,0 ng mL<sup>-1</sup> de proteases através de dot-ELISA em uma concentração celular de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> enquanto AZCONA et al. (1989) detectaram também 1,0 ng mL<sup>-1</sup> com sanduíche de duplo anticorpo ELISA. A ocorrência de 1,0 ng mL<sup>-1</sup> de protease em leite antes do tratamento para UAT é suficiente para reduzir seu tempo de vida (Mitchell e Ewings, 1985, citados por PUNJ e MATTA, 1995). Dentre as proteases de 26 estirpes de *Pseudomonas* sp., AZCONA et al. (1989) encontraram compatibilidade imunológica em oito, utilizando anti-soro contra proteases de *P. fluorescens* AH-70, e concluíram pela necessidade de preparação de anti-soros de especificidade ampla, para aplicação desse procedimento, visando detectar e, ou, quantificar proteases extracelulares em leite. Os métodos imunológicos de detecção e quantificação de proteases bacterianas apresentam ainda algumas limitações a serem resolvidas. Essas limitações incluem: detecção de proteases somente é possível, quando o número de células está acima de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>; não detecta proteases imunologicamente não-relacionadas. Além disso, a atividade antigênica nem sempre reflete a atividade proteolítica residual, após tratamentos térmicos, considerando a possibilidade de alterações conformacionais das proteases.

DRACZ (1996) adaptou o método imunoenzimático (“imunodot-blot”), para determinação de caseinomacropéptido -CMP em leite, e a proteólise do leite refrigerado a 4 °C, 7 °C, e 10 °C foi detectada após 96 h de estocagem, por “imunodot-blot” e pelo método HPLC-GF. Entretanto, o autor observou que, a partir de 48 h de estocagem, o leite já seria condenado pelos testes rápidos de qualidade previstos na legislação, incluindo a acidez, alizarol e resistência à fervura.

Técnicas imunológicas são consideradas promissoras, para a estimativa de células de psicotróficos, tendo em vista a sensibilidade e rapidez dos procedimentos. A necessidade de determinação de antígeno e anticorpo adequados é facilmente resolvida em bactérias Gram-negativas, considerando-se que proteínas da membrana externa são antígenos comuns para gêneros e, ou, espécies (GONZÁLEZ et al., 1996). GONZÁLEZ et al. (1996) demonstraram que o anticorpo contra proteínas F de *P. fluorescens* AH-70 (anti-PF) reconheceu determinantes antigênicos de várias estirpes de *Pseudomonas*, incluindo duas outras espécies, mas não apresentava reação cruzada com outros gêneros de psicotróficos avaliados. Esses pesquisadores concluíram que a proteína F da membrana externa de *P. fluorescens* AH-70 é específica do gênero, e detectaram  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^5$  UFC.cm<sup>-2</sup> em carnes, por meio da técnica de ELISA indireta.

As reações antígeno-anticorpo podem ter interferências em função das condições ambientais nas quais se desenvolvem. GONZÁLEZ et al. (1996) encontraram a mesma capacidade de reconhecimento de todas as estirpes de *Pseudomonas* por anticorpos antiPF extraídos de carne em solução salina (KCl 0,1 M). Por outro lado, houve uma diferenciação de reconhecimento de antígenos de espécies diferentes pesquisadas diretamente em leite com o mesmo anticorpo (GONZÁLEZ et al., 1993).

Os resultados observados na literatura indicam que há a necessidade de mais estudos, para o desenvolvimento e o aprimoramento de métodos imunológicos, para a quantificação de células microbianas. Esses métodos apresentam potencial de aplicação na predição da vida de prateleira dos produtos acabados, considerando a rapidez e o grau de sensibilidade que os caracterizam.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia e no Laboratório de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

#### 3.1. Manutenção e ativação de *P. fluorescens*

Foram utilizadas estirpes de *P. fluorescens* isoladas de leite cru refrigerado, obtidas por PINTO (2004), e caracterizadas quanto à presença de gene *apr* (MARTINS et al., 2005). As estirpes 07A, 033, 041, 077, 096, 0123 e 0141 foram selecionadas em função da maior atividade proteolítica em leite desnatado reconstituído a 12% (PINTO, 2004) e a estirpe 097 em função de maior capacidade de adesão (Eliseth S. Viana, 2005, comunicação pessoal)<sup>1</sup>. Esses isolados foram mantidos sob refrigeração, a 5 °C, em 4 mL de infusão de cérebro coração - BHI (Difco<sup>®</sup>) semi-sólido contendo 0,7% de ágar, em tubos de 10 mm x 100 mm, com tampa rosqueável, com renovação a cada três meses. Culturas estoques desses isolados também foram conservadas a – 86°C em caldo BHI acrescido de 20% de glicerol.

Antes de serem usados nos experimentos, esses microrganismos foram ativados em caldo BHI e em seguida transferidos para leite desnatado reconstituído (LDR) a 1%, preparado em solução salina (HOOD e ZOTTOLA, 1997); em LDR a 12% em água, ou

---

<sup>1</sup> Informação pessoal. Doutoranda em Microbiologia Agrícola, Dep. de Microbiologia – UFV.

em caldo triptona extrato de levedura e fosfato (TYEP) composto por 1 g de triptona; 0,25 g de extrato de levedura; 0,1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (MALIK et al., 1985), para uma segunda ativação. A ativação desenvolveu-se a 26 °C, durante 24 h, em meio de cultura correspondente ao adequado à etapa específica dos experimentos.

### **3.2. Avaliação da adesão e da formação de biofilmes a diferentes temperaturas**

#### **3.2.1. Preparo de cupons de aço inoxidável**

Foram utilizadas placas de aço inoxidável AISI 304, acabamento # 4 de 1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm, perfuradas em um dos vértices e denominadas cupons. Para manter os cupons suspensos e imersos no meio de cultura líquido, foram utilizados fios de níquel-cromo tipo duro-elástico de 0,50 mm de diâmetro (Morelli<sup>®</sup>). Os fios foram cortados em dois tamanhos diferentes, para manter os cupons imersos e dispostos, alternadamente, em alturas diferentes. Em uma das extremidades de cada fio, foi emoldurado um gancho adequado à sua fixação na boca do frasco erlenmeyer, e uma projeção, através da qual o fio era segurado e transferido. Na outra extremidade, um gancho era emoldurado, para conter o cupom (Figura 1). Para limpeza e esterilização, os cupons e os fios foram tratados segundo procedimentos de ANDRADE et al. (1998a) com modificações. Foram esfregados com auxílio de uma escova de cerdas macias e com detergente neutro líquido em água e, a seguir, enxaguados por quatro vezes, em água destilada. Resíduos de gorduras foram retirados pela imersão em acetona durante 30 min. A seguir, foram imersos em solução de NaOH 0,1 N durante 1 hora, e enxaguados por quatro vezes com água destilada. Após secagem ao ar, cada cupom foi preso na extremidade adequada do fio, embrulhado em papel Kraft, e esterilizado a 121 °C, durante 15 min, em autoclave.

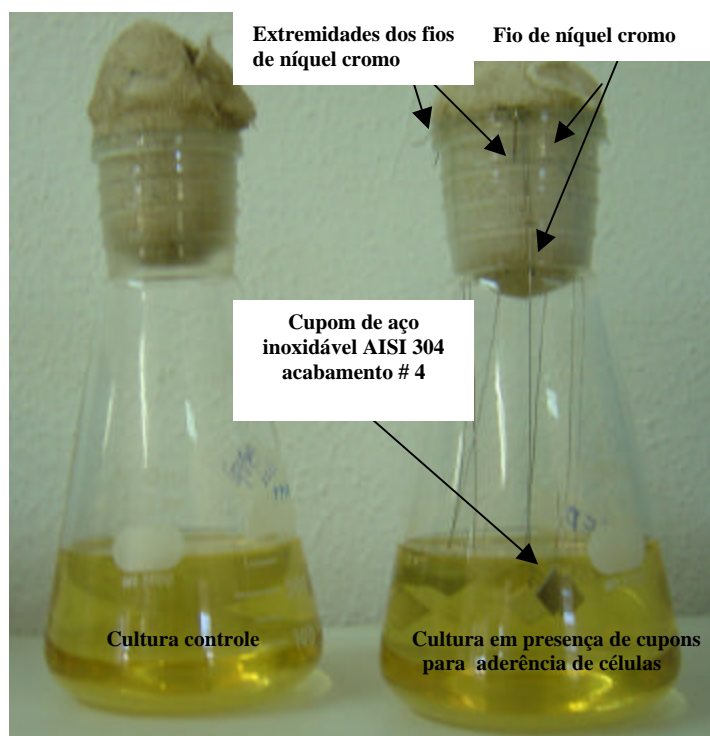


Figura 1 – Frascos erlenmeyers contendo meio de cultura TYEP para cultivo de *P. fluorescens* em ausência (Controle) e presença de cupons de aço inoxidável AISI 304 acabamento # 4.

### 3.2.2. Determinação da adesão da cultura mista de *P. fluorescens*

Frascos Erlenmeyer de 1.000 mL contendo 280 mL de LDR a 12% foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min, com abaixamento rápido da temperatura e pressão, para prevenir a reação de Maillard.

O LDR foi inoculado com uma alíquota de 2,8 mL das culturas ativadas de cada uma das sete estirpes, obtendo-se, aproximadamente,  $7 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Após homogeneização, foram introduzidos em dois dos quatro erlenmeyers, 10 cupons de aço inoxidável suspensos em fio de níquel-cromo esterilizados. Barras magnéticas foram previamente colocadas em cada um dos erlenmeyers e a incubação foi a 22 °C, em estufa incubadora BOD (FANEM<sup>®</sup>) sobre placa multiponto (Eletronicruher Multipont<sup>®</sup> HP6) em agitação constante de 150 rpm.

O primeiro cupom foi retirado dois a quatro minutos após ser inserido no meio inoculado e transferido para tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril, para enxágüe e posterior quantificação de células aderidas, em tempo zero. A cada 24 h,

os cupons foram assepticamente removidos, lavados em 280 mL de solução salina esterilizada e transferidos para um novo frasco contendo 280 mL de LDR 12% (JOSEPH et al., 2001) previamente inoculado como descrito acima. Um cupom foi transferido para tubo de ensaio com 10 mL de solução salina, para posterior quantificação de células aderidas. Durante o período de incubação de 120 h, amostras do meio de cultura foram retiradas a cada 24 h, para a determinação do número de células viáveis planctônicas e da atividade proteolítica. As alíquotas coletadas para a determinação da atividade proteolítica foram estocadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  após a remoção das células por centrifugação. As células removidas foram armazenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior detecção em provas imunológicas.

O experimento foi conduzido também a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 144 h de incubação, isto é, por 7 dias. A essa temperatura, a cada 48 h foram feitas as transferências dos cupons para os meios de cultura recém-inoculados e a retirada para quantificação de células aderidas; as amostragens de meio de cultura, para a quantificação de células planctônicas viáveis e para dosagem de atividade proteolítica. Foram realizadas duas repetições desses experimentos com duplicatas e os resultados apresentados como médias aritméticas dos dados obtidos.

### **3.2.3. Adesão e formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável por *P. fluorescens* 041 e 097**

A estirpe de *P. fluorescens* 041 foi cultivada em 280 mL de LDR 1% preparado em solução salina (HOOD e ZOTTOLA, 1997) e em caldo TYEP. A estirpe 097 foi cultivada em LDR 12% e em caldo TYEP. As incubações foram sem agitação (HOOD e ZOTTOLA, 1997), a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A cada 24 e 48 h, a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, repetiram-se os procedimentos descritos anteriormente. Os cupons foram transferidos para os meios de cultura recém-inoculados, retirando-se um exemplar para quantificação de células aderidas. Foram retiradas amostras de meios de cultura para quantificação de células planctônicas viáveis e para dosagem de atividade proteolítica.

### **3.2.4. Quantificação de células planctônicas**

Células planctônicas foram quantificadas, plaqueando-se diluições decimais seriadas do meio de cultura, pela técnica de microgotas em ágar tripticaseína e soja –

TSA (Merck®). Após incubação por 18 a 24 h, a 26 °C, as contagens foram feitas com auxílio de lupa (Olympus® – SZ40).

### **3.2.5. Quantificação de células aderidas**

As células aderidas em cupons foram quantificadas segundo metodologia de WHITELEY et al. (1997), com modificações. Os cupons retirados dos frascos de cultura foram lavados em solução salina estéril, para retirada de células não-aderidas. A seguir, foram mergulhados em 10 mL de salina estéril em tubo de ensaio e tratados com ultra-som (Ultrasonic Cleaners® – Model 1510), durante 30 min. Essa suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos durante um minuto, plaqueando-se todas as diluições pela técnica de microgotas em TSA.

Os cupons limpos foram corados com laranja de acridina 0,04% e observados em microscopia de epifluorescência, para confirmar a remoção total das células aderidas (JEONG e FRANK, 1994). Após enxágüe em solução fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,31 M, pH 7,2), os cupons foram depositados e afixados em lâminas de microscopia com fita adesiva dupla-face. Foram recobertos com solução Kirkpatrick (álcool isopropílico, clorofórmio e formaldeído, 6:3:1), durante 10 min, para fixação das bactérias. A seguir, foram recobertos com laranja de acridina 0,04% durante 5 min (PARIZZ1, 1999). O excesso de corante foi retirado com enxágüe brando em solução fosfato. Procedeu-se ao exame dos cupons corados, em microscópio de epifluorescência (Olympus® BX50) em aumento de 100 vezes e com filtro Ib2 e Wb.

### **3.2.6. Observação de adesão e de biofilmes ao microscópio eletrônico de varredura**

Durante 17 dias, os cupons foram mantidos em LDR 12% a 22 °C. A cada 24 h, eram lavados em solução salina estéril e transferidos para meio de cultura recém-inoculado com as sete estirpes de *P. fluorescens*. Procedimento semelhante foi repetido em TYEP e LDR 1% inoculado com *P. fluorescens* 041 e em TYEP e LDR 12% com *P. fluorescens* 097, cultivadas durante 21 dias a 7 °C e 22 °C, sendo, posteriormente, lavados e transferidos para meios recém-inoculados a cada 48 e 24 h, respectivamente. Para observação ao microscópio eletrônico de varredura, cada cupom era mantido durante 10 min em tampão PBS 0,05 M, para retirada de íons originários da solução salina. Em seguida, os cupons foram tratados durante uma hora com glutaraldeído 2,5%

e tampão PBS 0,1M, 1:1. Seguiram-se seis lavagens em tampão PBS 0,05 M, durante 10 min cada. Para desidratação, foi feito o tratamento em série etanólica, sendo de 10 min, em cada uma das graduações de 30 °, 50 °, 70 °, 80 ° e 95 ° Gay Lussak –GL e três tratamentos de 15 min em etanol a 100° GL. Os cupons foram transferidos para o secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer– CPD<sup>®</sup>, Bal Tec, modelo 30), para desidratação total. Finalmente, foram metalizados (Balzers<sup>®</sup>, modelo FDU 010). Fez-se análise ao microscópio eletrônico de varredura (LEO<sup>®</sup> mod. VP 1430), e registraram-se as imagens.

### **3.3. Determinação da atividade proteolítica**

A atividade proteolítica foi avaliada no sobrenadante das culturas com e sem cupons para adesão e formação de biofilmes, em cada temperatura e intervalo de tempo de cultivos determinados anteriormente. A atividade foi determinada segundo metodologia de EWINGS et al. (1984), utilizando-se azocaseína a 0,5% como substrato. As leituras foram feitas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 366 nm (Beckman<sup>®</sup> –Du 640). O valor de absorbância foi transformado em unidades de atividade enzimática, considerando que uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de promover aumento de 0,01 de absorbância em um período de uma hora (EWINGS et al., 1984).

### **3.4. Preparo de antígenos e imunógenos e técnicas imunológicas desenvolvidas**

#### **3.4.1. Preparo de massas celulares imunogênica e antigênica**

Um volume de 20 mL de cultura da segunda ativação de cada um dos sete isolados de *P. fluorescens* foi inoculado em 200 mL de caldo BHI seguindo-se incubação a 26 °C, durante 24 h. As culturas foram centrifugadas a, aproximadamente, 4.000 g, a 10 °C (Sorvall<sup>®</sup> RT 6.000) e o sobrenadante foi desprezado. As células foram lavadas por três vezes em solução salina (NaCl, 0,85%), pH 7,0, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições. As células coletadas foram ressuspensas em 5 mL de solução salina e, após diluições sucessivas, alíquotas foram plaqueadas pela técnica de microgotas em TSA, para quantificação celular dessa suspensão. O volume restante foi distribuído em tubos Eppendorf<sup>®</sup>, centrifugado, desprezando-se o sobrenadante. A

massa celular resultante de cada cultura foi congelada em nitrogênio líquido e em seguida armazenada a - 86 °C, para posterior preparo de imunógenos e antígenos.

Os imunógenos foram preparados, ressuspendendo-se as células congeladas em solução salina, até obtenção de concentração celular de  $3,0 \text{ UFC.mL}^{-1} \times 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$  (MEZENCIO, 1981). Cada imunógeno foi constituído pela associação de duas a três estirpes de *P. fluorescens*, psicrotróficas e proteolíticas, na proporção de 1:1:1. A seleção das estirpes para composição das misturas baseou-se na semelhança genética demonstrada por MARTINS (2003), correspondendo a menos de 20%. A composição de cada imunógeno está detalhada no Quadro 1. Cada imunógeno foi emulsificado com adjuvante completo de Freund (Sigma<sup>®</sup>), na proporção de 1:1 (MEZENCIO, 1981), para o primeiro estímulo imunogênico. Para aplicações subseqüentes, foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund. Foram obtidos três anti-soros, A, B e C, correspondentes a três animais, contra cada imunógeno aplicado, 01, 02 e 03 (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição dos imunógenos para a produção de anticorpos policlonais contra *P. fluorescens* e semelhança genética entre as estirpes usadas

Imunógenos	Estirpes de <i>P. fluorescens</i> componentes de cada imunógeno	Semelhança genética entre as estirpes (%)	Identificação dos anti-soros obtidos
01	033 e 07A	7	1A, 1B e 1C
02	041, 096 e 0123	3 a 13	2A, 2B e 2C
03	077 e 0141	13	3A, 3B e 3C

### 3.4.2. Produção de anti-soros policlonais contra *P. fluorescens*

Foram utilizados três coelhos albinos, com três a quatro meses de idade e peso entre 1.800 a 2.000 g, da raça Nova Zelândia, para aplicação de cada imunógeno (MEZENCIO, 1981). Foram feitas aplicações via intramuscular nas patas traseiras e via subcutânea no dorso do pescoço do coelho. Na primeira aplicação, injetou-se 1,5 mL de emulsão constituída de suspensão celular e adjuvante completo de Freund. Em

intervalos de 15 dias, foram injetadas mais duas doses de 1,5 mL da emulsão de suspensão bacteriana e adjuvante incompleto de Freund.

Com o objetivo de avaliar a produção de anticorpos, 10 dias após a segunda aplicação de imunógeno, foram coletados 10 mL de sangue da veia marginal da orelha dos coelhos, para obtenção de anti-soro. A presença de anticorpos foi avaliada pela técnica de aglutinação em gota, promovendo-se a combinação entre todas as diluições de anti-soro e todas as diluições de antígenos. Os anti-soros e antígenos foram diluídos de 1/2 a 1/4096.

O sangue dos animais foi coletado 15 dias após o último estímulo imunogênico (DRACZ, 1996), por punção cardíaca. Os anti-soros obtidos foram distribuídos em alíquotas de 1,0 mL ou 1,5 mL e armazenados a -20 °C, até o momento do uso. A aglutinação em gota, imunodifusão dupla e imunodot-blot foram as técnicas utilizadas para avaliar o título dos anti-soros obtidos.

### **3.4.3. Preparo dos antígenos para titulação dos anti-soros**

Com o objetivo de obter o título dos anti-soros, utilizaram-se os antígenos celulares preparados a partir do centrifugado de células de cada estirpe de *P. fluorescens* armazenados a -86 °C. A massa celular foi ressuspensa em solução de NaCl 0,85%, obtendo-se concentração celular de  $1,5 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Diluições sucessivas foram realizadas, para obtenção de concentrações celulares de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Antígenos combinados, de composição correspondente aos imunógenos aplicados nos coelhos, foram preparados a partir das suspensões anteriores em proporções adequadas, para a obtenção de concentração final de células desejada.

Os nove anti-soros obtidos (1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B e 3C) foram titulados pela técnica de aglutinação em gota nas diluições 1/ 2 a 1/4096. Avaliou-se nesta etapa a temperatura de 37 °C e tempo para desenvolvimento da reação de aglutinação.

Para a obtenção de antígenos solúveis, o concentrado de células da cultura mista congelado foi ressuspensa em tampão salina fosfato -PBS, obtendo-se concentrações de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A seguir, foram fervidos em banho-maria durante 1 hora. Após centrifugação a 4.000 g, os sobrenadantes foram armazenados a -18 °C, para

posteriores provas por imunodifusão dupla IDD (OUCHTERLONY, 1968). Um segundo tipo de antígeno solúvel foi preparado. Volumes de 4 mL da suspensão de cada antígeno em PBS, em diversas concentrações, foram tratados em pressurizador de células (*French Pressure Cells and Cells*<sup>®</sup>) a 100 libras (Kg cm<sup>2</sup>) de pressão. Alíquotas de 2 mL foram armazenadas em congelador a -18 °C como antígeno pressurizado integral, e o restante centrifugado e armazenado, separadamente, como sobrenadante e precipitado, para posteriores provas em IDD.

#### 3.4.4. Técnica de aglutinação em gota

Os testes de aglutinação em gota foram conduzidos segundo MEZENCIO (1981). A parede externa do fundo de placas de Petri foi dividida em 16 quadrantes, utilizando-se caneta hidrográfica. A superfície interna do fundo da placa de Petri foi revestida com Formvar<sup>®</sup> (15/95E Sigma) em clorofórmio a 0,3%, para torná-la hidrofóbica, evitando espalhamento das gotas a serem depositadas.

Para monitorar a produção de anticorpos, procedeu-se à diluição sucessiva, em solução salina dos antígenos Ag e dos anti-soros AS, a partir de suas concentrações celulares iniciais ( $1,5 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>), de 1/2 a 1/4096, em placas de microaglutinação. Os antígenos foram constituídos por cada uma das sete estirpes de *P. fluorescens* e compostos como para os imunógenos. Alíquotas de 10 µL de Ag e AS diluídos foram transferidas para o centro de cada quadrante delimitado nas placas de Petri, estabelecendo-se a combinação de todas as diluições dos dois elementos entre si. Para controle das reações, 10 µL de solução salina foram depositados nos quadrantes 14 e 15, onde foram acrescentados, respectivamente, os mesmos volumes de Ag e AS não-diluídos. No quadrante 13, foram depositados os Ag e AS não-diluídos.

Os anti-soros obtidos foram diluídos de 1/2 a 1/4096 e testados com antígenos em concentrações celulares de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. As reações de aglutinação ocorreram a 37 °C, durante duas a cinco horas, e procedeu-se à leitura em lupa binocular com aumento de 1,5 vezes.

Em fase posterior dos experimentos, a estirpe de *P. fluorescens* 097 foi utilizada como antígeno e testada por essa técnica, nas concentrações de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

### 3.4.5. Técnica de imunodifusão dupla

Visando comparar a eficiência de técnicas para detecção da mistura de estirpes de *Pseudomonas*, foi realizado o método de imunodifusão dupla. O fundo de placas de Petri foi revestido de uma camada de ágar a 0,1%, em água, e, após secagem, foram acrescentados 15 mL de ágar nobre 0,9% (Difco<sup>®</sup>) em tampão salina borato pH 8,4 a 8,5. Quatro conjuntos de orifícios foram distribuídos em quatro áreas da placa de Petri. Cada conjunto constituiu-se de uma seqüência de seis orifícios equidistantes em torno do orifício central. Nos orifícios centrais, foram depositados 10 L dos antígenos. Foram utilizados antígenos solúveis, de cada estirpe e compostos como para os imunógenos, oriundos de suspensões bacterianas nas concentrações de 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Os anti-soros obtidos foram diluídos de 1/2 a 1/4096 e distribuídos nos orifícios em torno, em igual volume. Ao lado de cada conjunto depositou-se, em dois orifícios, o antígeno e o anti-soro sem diluição. As placas permaneceram em temperatura ambiente, em câmara úmida, durante 24 h. Na leitura, bandas de precipitação indicaram reação positiva.

### 3.4.6. Técnica de imunodot-blot

Células da estirpe de *P. fluorescens* 077 e anti-soro 3B foram utilizados em testes de imunodot-blot, com os objetivos de avaliar e comparar eficácia da técnica. O antígeno em concentração celular inicial de 5 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> foi diluído de 1/2 a 1/4096 para reagir com anti-soro em diluição única de 1/10. Posteriormente, foram utilizados antígenos sem diluição nas concentrações celulares de 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e anti-soro nas diluições 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160. Foram utilizados discos de membrana de nitrocelulose (Bio Rad<sup>®</sup>) de 5 mm de diâmetro, enumerados com grafite em uma das faces em seqüência de 1 a 12 e, posteriormente, 1 a 5, correspondendo às diluições de antígeno e anti-soro, respectivamente. Quatro discos para reações controle foram marcados com CN (negativo) e CP (positivo). O controle positivo era constituído do antígeno de *P. fluorescens* 077 em concentração celular de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e anti-soro 3B diluído 1/10. Para o controle negativo, o antígeno foi substituído por tampão bicarbonato.

Com auxílio de micropipeta, 2 L de antígeno suspenso em tampão carbonato-bicarbonato (80 mL de solução de carbonato de sódio 0,1 M; 170 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,1 M e água deionizada q.s.p. 100 mL, pH 9,6) foram depositados sobre os discos de nitrocelulose numerados, que permaneceram em secagem à temperatura ambiente, durante 30 min. Os discos foram transferidos para orifícios de placa de ELISA, contendo esferas de vidro de 2 mm de diâmetro e mergulhados em 200 L de tampão salina fosfato adicionados de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (PBST), pH 4,7, permanecendo sob agitação em placa agitadora a 180 rpm, por 10 min. Esse procedimento foi repetido três vezes, para bloqueio de sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose e eliminação de antígenos não-aderidos. Foram adicionados 200 L de Ac primário (AS 3B) e a reação Ag-Ac desenvolveu-se durante uma hora, em agitação. Por três vezes, os discos foram lavados com 200 L de PBST, sob agitação, durante 10 min cada. Alíquota de 200 L de imunoglobulina G (IgG) de cabra marcada com peroxidase (Sigma<sup>®</sup>), anti IgG de coelho diluído 1/1000 em PBST foi adicionada e aguardou-se uma hora para desenvolvimento da reação, em agitação constante. Foram feitas três lavagens com 200 L de PBST, durante 10 min cada, em agitação. Adicionaram-se, a seguir, 100 L de solução de diaminobenzidina (DAB, Sigma<sup>®</sup>), preparada conforme se segue: 10 mg de diaminobenzidina; 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,6; 1,0 mL de cloreto de níquel 0,3%; 10 L de peróxido de hidrogênio 30%. Após 10 min sob agitação, a reação foi interrompida, acrescentando-se 200 L de água destilada. Após a retirada do material líquido com pipeta Pasteur e bomba de vácuo, a placa foi transferida para estufa a 35 °C até a secagem das membranas. Fez-se a leitura direta, verificando-se a formação de mancha escura nos discos, indicativa da reação positiva.

#### **3.4.7. Detecção de *P. fluorescens* em LDR 12%**

Foram avaliadas a sensibilidade e a precisão dos métodos de aglutinação em gota, descritas no item 3.4.4. e imunodot-blot, conforme item 3.4.6, pesquisando-se a presença de células de *P. fluorescens* nos centrifugados de células obtidos dos cultivos em LDR 12%, a 22 °C. Os centrifugados foram ressuspensos em solução salina com auxílio de fio de níquel-cromo, e centrifugados a 2.000 g, descartando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes, para lavagem da massa celular. Finalmente, foram ressuspensos em 1 mL de solução salina em concentrações de

$10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e submetidos aos testes de aglutinação em gota com todos os anti-soros em 12 diluições. Essas mesmas concentrações celulares foram mantidas em suspensões em tampão carbonato-bicarbonato, para realização de testes em imunodot-blot com os anti-soros 1A, 1B, 1C, 2B e 3B.

Por meio dessas técnicas, avaliou-se a ocorrência de reações entre anti-soros 2A, 2B, 3A e 3B e a estirpe de *P. fluorescens* 097, não componente dos imunógenos aplicados, nas concentrações celulares de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **3.4.8. Determinação de reação cruzada dos anti-soros policlonais contra *P. fluorescens***

A reação dos anti-soros com as estirpes das bactérias psicrotólicas Gram-negativas, *Pseudomonas putida* 013, *Serratia liquefaciens* 038, *Burkholderia pseudomallei* 056, *Aeromonas hydrophila* 099 e *Chryseomonas luteola* 041, isoladas de leite cru (PINTO, 2004) e armazenadas a -86 °C foi averiguada, pela técnica de aglutinação em gota. Após 24 h de incubação a 26 °C, em BHI, esses microrganismos foram lavados e ressuspensos em solução salina nas concentrações de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e utilizados em reações de aglutinação.

A possibilidade de detecção de *P. fluorescens* em leite *in natura* foi averiguada pela técnica de aglutinação em gota, em três amostras de leite cru armazenadas sob refrigeração. Antes da realização das reações, as amostras foram centrifugadas, lavadas por três vezes com solução salina esterilizada e o centrifugado ressuspense em solução salina.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Adesão e formação de biofilmes por *P. fluorescens* a diferentes temperaturas

A cada 24 h de incubação a 22 °C, o número de células planctônicas da cultura mista, constituída de sete estirpes de *P. fluorescens*, atingiu o máximo de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em LDR 12%, em presença ou em ausência de cupons de aço inoxidável (Figura 1). O número de células, aderidas aos cupons de aço inoxidável, aumentou, proporcionalmente ao aumento da população de células planctônicas, e contagens semelhantes foram obtidas após 72 h de incubação (Figura 2). Este tempo de incubação e este número de células aderidas são considerados suficientes para caracterizar a formação de biofilmes por *P. fluorescens* (ALLISON et al., 1998). Considera-se que biofilmes são estruturas estabilizadas, quando têm  $10^7$  células cm<sup>-2</sup> (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). Bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre as bactérias consideradas como de alta capacidade de formação de biofilmes (POULSEN, 1999), especificamente, a espécie *P. fluorescens* que forma biofilme em superfície abiótica, quando cresce em meio com nutrientes suficientes. A adesão moderada de células de *P. fluorescens* em cupons de aço inoxidável foi verificada após uma hora de incubação em meio de cultura rico como em Trypticaseína e soja - TSB (HOOD e ZOTOLLA, 1997). Para o desenvolvimento de biofilmes por essa espécie bacteriana, KORBER et al. (1989) sugeriram ser necessário um período de cinco horas.

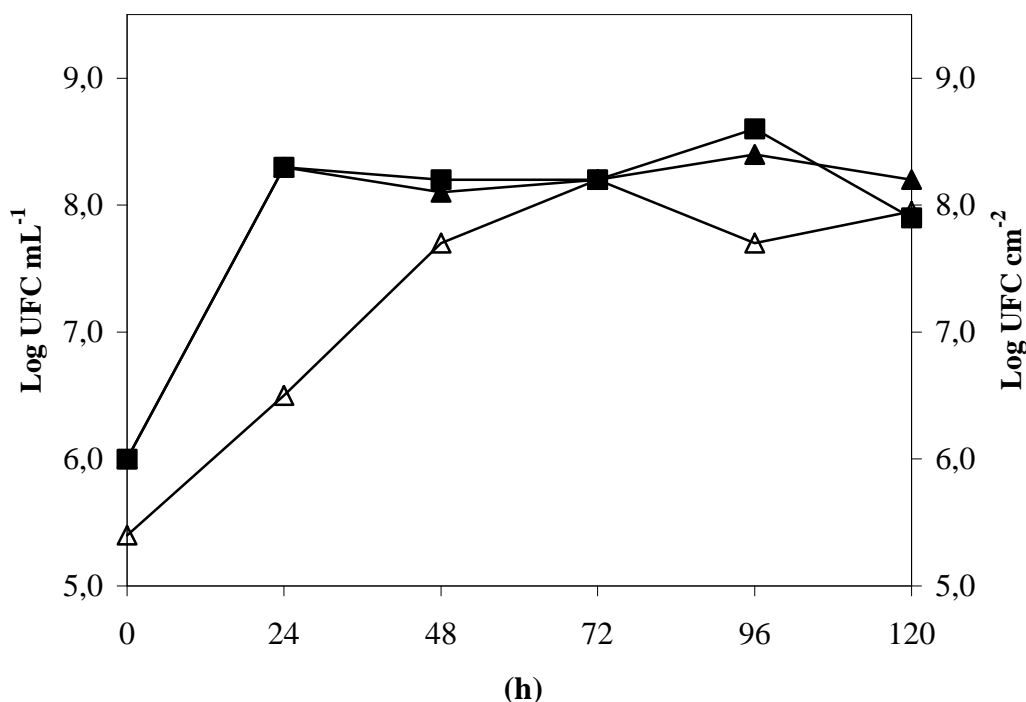


Figura 2 – Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) da mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* planctônicas em LDR 12 % na presença (■) ou ausência (△) de cupom de aço inoxidável e logaritmo do número de UFC aderidas (UFC.cm<sup>-2</sup>) em cupons de aço inoxidável (▲) incubados a 22 °C, com agitação.

O número de células planctônicas não alterou no meio LDR 12%, quando havia cupons de aço inoxidável contendo uma população elevada de células aderidas, indicando que a liberação de células sésseis para o meio não foi expressiva (Figura 2). A agitação durante o cultivo da cultura mista de sete estirpes de *P. fluorescens* a 22 °C não impediu a adesão celular e não favoreceu o desprendimento de células. Tanques de expansão e silos para armazenamento de leite, em temperaturas de refrigeração, são mantidos em agitação, para homogeneização e para evitar o congelamento, e este procedimento não é suficiente para a prevenção da adesão bacteriana e posterior formação de biofilmes. A influência do movimento do meio líquido na formação de biofilmes foi avaliada por muitos autores, e os resultados diferem de acordo com o microrganismo pesquisado. DUDDRIDGE et al. (1982) observaram que maior número de *P. fluorescens* aderiu na periferia das placas esféricas de aço inoxidável AISI 316. Essa região correspondia à área da superfície com fluxo mais brando do meio de cultura

lançado, sob pressão, a partir do centro da placa. Maior tempo de exposição e maior concentração de células favoreceram a adesão independente da força do fluxo. BAGGE et al. (2001) verificaram que, sob agitação, o número de células de *Shewanella putrefasciens* aderidas a cupons de aço inoxidável não ultrapassou a  $10^2$  UFC.cm<sup>-2</sup>, enquanto, sem agitação, este valor foi de  $10^9$  UFC.cm<sup>-2</sup>. SIMÕES et al. (2005) verificaram que 76% do biofilme formado por *P. fluorescens* permaneceram na superfície de um reator de aço inoxidável após ser submetido a um estresse mecânico, provocado por agitação de 300 rpm.

De acordo com a Figura 3, o crescimento de células planctônicas da estirpe de *P. fluorescens* 041 em LDR 1% foi semelhante ao obtido com a cultura mista das sete estirpes de *P. fluorescens* em LDR 12%, na mesma temperatura (Figura 2). Em meio TYEP, esse crescimento foi estimulado, atingindo, aproximadamente,  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Apesar do maior crescimento da estirpe 041 em meio TYEP do que em LDR 1%, o número de células aderidas não foi dependente do número de células planctônicas. O efeito da composição nutricional do meio e das condições ambientais sobre a formação de biofilmes por *P. fluorescens* foi demonstrado por O'TOOLE e KOLTER (1998a). Esses autores concluíram que existem condições ambientais que promovem o crescimento celular, mas não estimulam a formação de biofilmes.

Embora o número máximo de células aderidas aos cupons de aço inoxidável tenha sido da ordem de  $10^8$  UFC.cm<sup>-2</sup> em TYEP, observou-se a redução deste número com o prolongamento do período de incubação, indicando a passagem das células do estado sésil para planctônico (Figura 3). Um decréscimo do número de células de *P. fluorescens* aderidas a cupons de aço inoxidável também foi observado em meio TSB e em TSB diluído (HOOD e ZOTTOLA, 1997). Para esses autores, o decréscimo de células aderidas observado é difícil de se explicar e pode estar relacionado com mudanças no substrato promovidas pela atividade metabólica das células, que modifica o ambiente e afeta a aderência celular. A concentração de nutrientes, a fase de crescimento celular, a disponibilidade de cátions multivalentes, o estresse provocado por agitação e a presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* também podem ser considerados fatores importantes na liberação de células de biofilmes (HUNT et al., 2004). PARSEK e FUQUA (2004) acrescentam que a dispersão de células do biofilme pode acontecer, provavelmente, por uma hidrólise coordenada da matrix extracelular, pela ação de enzimas secretadas ou associadas à superfície celular. A perda de

exopolímeros em biofilmes de *P. fluorescens* B52, após 20 e 50 h de incubação foi constatada por ALLISON et al. (1998) que observaram uma aceleração dessas perdas, quando o cultivo era realizado em sobrenadante de culturas de dois dias. Em outras espécies bacterianas, esse fenômeno também foi descrito. CHAE e SCHRAFT (2001) verificaram a ocorrência de um ciclo de população de células livres e de produção de biofilmes em *Listeria monocytogenes*. Eles detectaram um aumento inicial da população no biofilme nos três primeiros dias de incubação e, então, uma redução no número de células e da produção de exopolissacarídeos. Após seis dias, houve novamente o aumento da população celular com subsequente aumento da formação do biofilme. A população máxima de *Vibrio cholerae* aderida em aço inoxidável e em vidro ocorreu após quatro horas de incubação, quando, então, reduziu, indicando desprendimento celular (WONG et al., 2002).

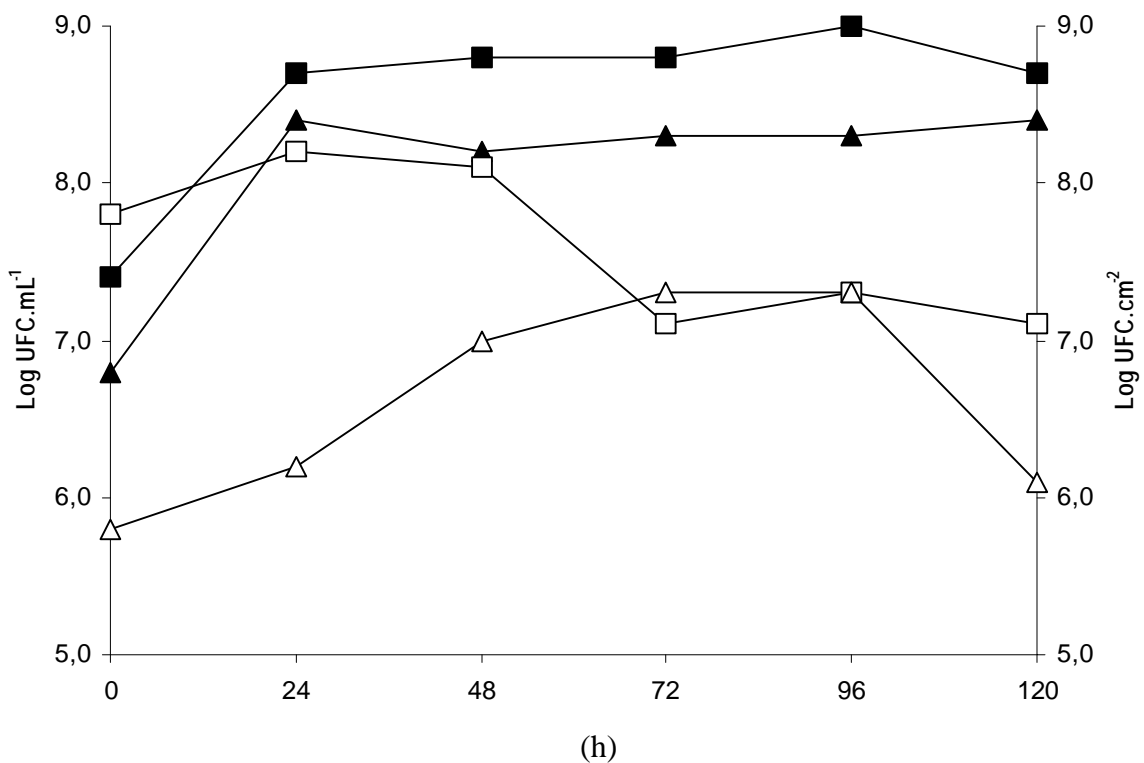


Figura 3 – Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) de células de *P. fluorescens* 041 planctônicas em LDR 1 % ( ) ou em caldo TYEP ( ) em presença de cupons de aço inoxidável e número de UFC aderidas (UFC.cm<sup>-2</sup>) em cupons de aço inoxidável em LDR 1% ( ) ou em caldo TYEP ( ), incubados a 22 °C, sem agitação.

O aumento do número de células de *P. fluorescens* 041 aderidas aos cupons na presença do meio LDR 1% a 22 °C foi de quase dois ciclos logarítmicos, após 72 h (Figura 3). Neste mesmo período, o número de células aderidas aos cupons imersos em caldo TYEP reduziu quase um ciclo logarítmico após ter alcançado número acima de  $10^6$  células aderidas  $\text{cm}^{-2}$ . Em TYEP ocorreu redução de quase um ciclo logarítmico (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por HOOD e ZOTTOLA (1997), que verificaram aumento de um ciclo logarítmico no número de células de *P. fluorescens* aderidas em cupons de aço inoxidável imersos em LDR 1% e redução nos cupons imersos em meio TSB, ao longo de 70 h de incubação, a 23 °C.

O número de células aderidas de *P. fluorescens* 041 em LDR 1% a 22 °C ao longo do período de 120 h de incubação foi menor do que o valor obtido com as sete estirpes de *P. fluorescens* em LDR 12%, na mesma temperatura. Diferentes fatores podem ser considerados para explicar essa variação. Por ser um meio mais concentrado em nutrientes, o LDR 12% pode promover a formação de filme condicionador de superfície mais favorável à adesão celular; ou o potencial de adesão é variável entre as sete estirpes avaliadas inicialmente, podendo haver estirpes com maior tendência à adesão do que a estirpe 041.

Quando incubada a 7 °C, a população de células planctônicas de *P. fluorescens* 041 atingiu o valor máximo aproximado de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> em caldo TYEP e aproximado de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em LDR 1%, após cada 48 h de troca de meio com subsequente incubação (Figura 4). Esta população máxima foi numericamente igual à encontrada nos cultivos conduzidos a 22 °C no período de 24 h (Figura 3). Embora tenha ocorrido redução da velocidade de crescimento a 7 °C, esta temperatura não impediu que a população máxima de células fosse alcançada. Estas observações destacam a importância do binômio tempo-temperatura de armazenamento de leite cru.

A adesão de *P. fluorescens* 041 aos cupons de aço inoxidável a 7 °C foi menor, quando cultivada em LDR 1%, do que em caldo TYEP (Figura 4), indicando que, nesta temperatura, o substrato afeta a adesão celular. Observou-se que os números de células aderidas aos cupons de aço inoxidável em presença de LDR 1%, a 7 °C, foram cerca de 0,5 a 1 ciclo logarítmico menor que quando a 22 °C (Figuras 3 e 4). A temperatura de 7 °C interferiu negativamente, com a adesão celular nesse meio de cultura. O percentual de células bacterianas, aderidas a cupons de aço inoxidável em presença de leite integral, aumentou, à medida que houve aumento de temperatura de 5 °C a 10 °C e 18 °C, representando 1,3%, 1,95% e 5,83% das células totais, respectivamente

(FIGUEIREDO, 2000). Este pesquisador considerou que a menor proporção de células aderidas em temperatura mais baixa podia ser decorrente da menor velocidade de crescimento celular. A velocidade de produção de exopolímeros pode também ser diminuída, interferindo na capacidade da adesão irreversível. STONE e ZOTTOLA (1985) observaram o aparecimento de fibrilas de adesão em *P. fragi* após 0,5 h a 25 °C e após 2 h a 4 °C, demonstrando que a síntese de exopolímeros torna-se mais lenta a temperaturas mais baixas.

O meio TYEP também resultou em maior crescimento da estirpe de *P. fluorescens* 097 do que em LDR 12% a 22 °C e o número de células planctônicas atingiu valores máximos acima de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 5). Embora se constitua em um meio rico, o LDR 12% resultou em uma população máxima de células de *P. fluorescens* 097 próximo de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 5).

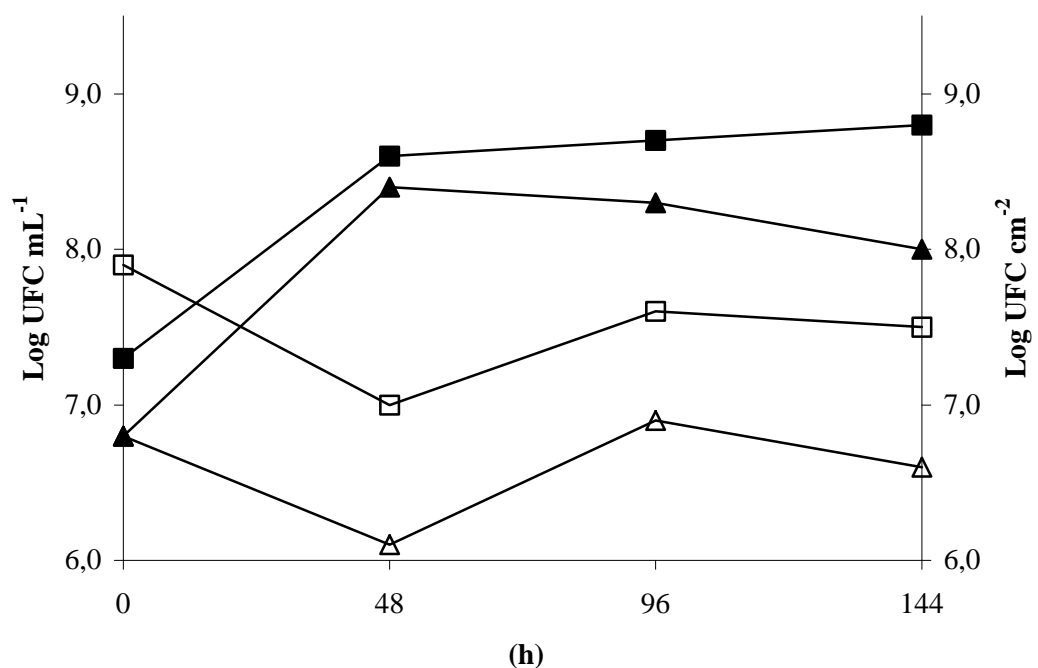


Figura 4 – Logaritmo do número de células viáveis (UFC.mL<sup>-1</sup>) planctônicas em presença de cupons de aço inoxidável. (símbolos fechados) e aderidas (UFC.cm<sup>-2</sup>) (símbolos abertos) de *P. fluorescens* 041, cultivadas em LDR 1% ( , ) e em TYEP ( , ) a 7 °C, sem agitação.

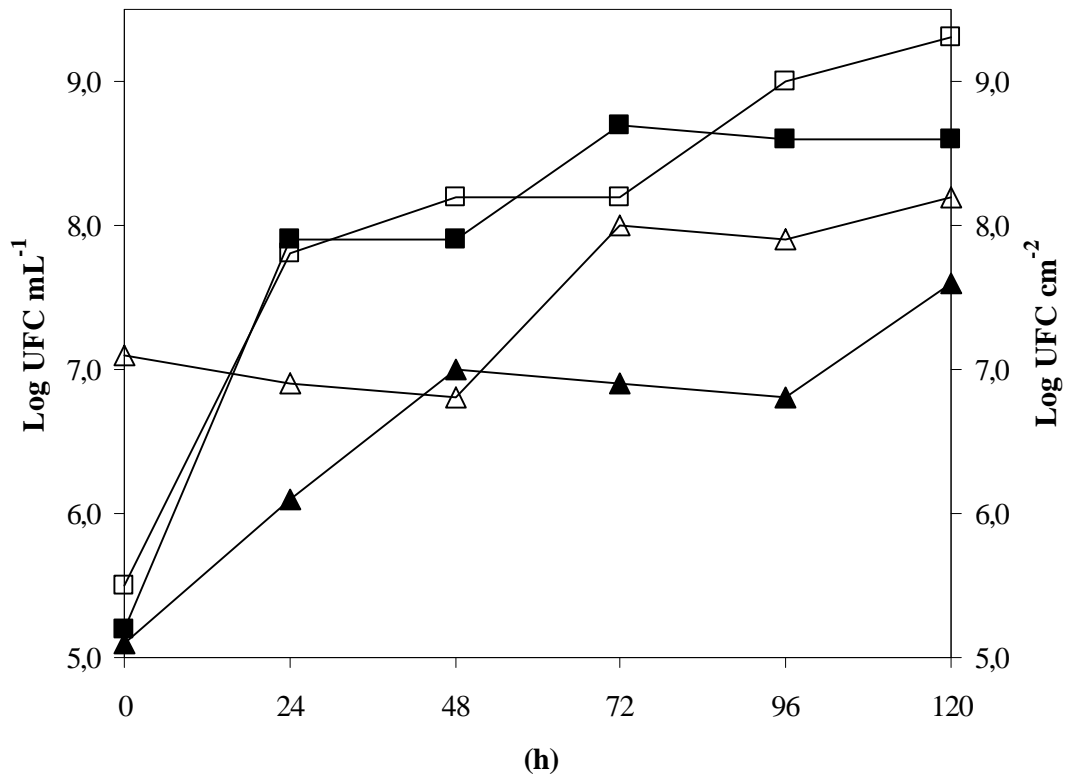


Figura 5 – Logaritmo do número de células viáveis (UFC.mL<sup>-1</sup>) planctônicas em presença de cupons (símbolos fechados) e aderidas (UFC.cm<sup>-2</sup>) (símbolos abertos) de *P. fluorescens* 097, cultivadas em LDR 12% ( , ) e em TYEP ( , ) a 22 °C, sem agitação.

Verificou-se que o número de células aderidas ultrapassou o número de células planctônicas, tanto em caldo TYEP quanto em meio LDR 12% (Figura 5). O número de células aderidas alcançou o máximo de 10<sup>9</sup> UFC.cm<sup>-2</sup> em TYEP e de 10<sup>8</sup> UFC.cm<sup>-2</sup> em LDR 12%, após incubação a 22 °C, por 120 h (Figura 5). Este resultado indicou maior potencial de adesão de *P. fluorescens* 097, quando comparada com a mistura de sete estirpes, constituída pelos isolados 07A, 033, 041, 077, 096, 0123 e 0141 e com a estirpe 041.

O maior potencial de adesão da estirpe 097 foi confirmado também quando a incubação foi a 7 °C (Figura 6). Contagens de 10<sup>9</sup> UFC.cm<sup>-2</sup> foram alcançadas em meio TYEP, após 96 h de incubação e em LDR 12% após 144 h de incubação (Figura 6). Confirmou-se também a observação anterior de que, com o prolongamento da

incubação e em ambos os meios avaliados, o número de células aderidas ultrapassa o número de células planctônicas (Figura 6).

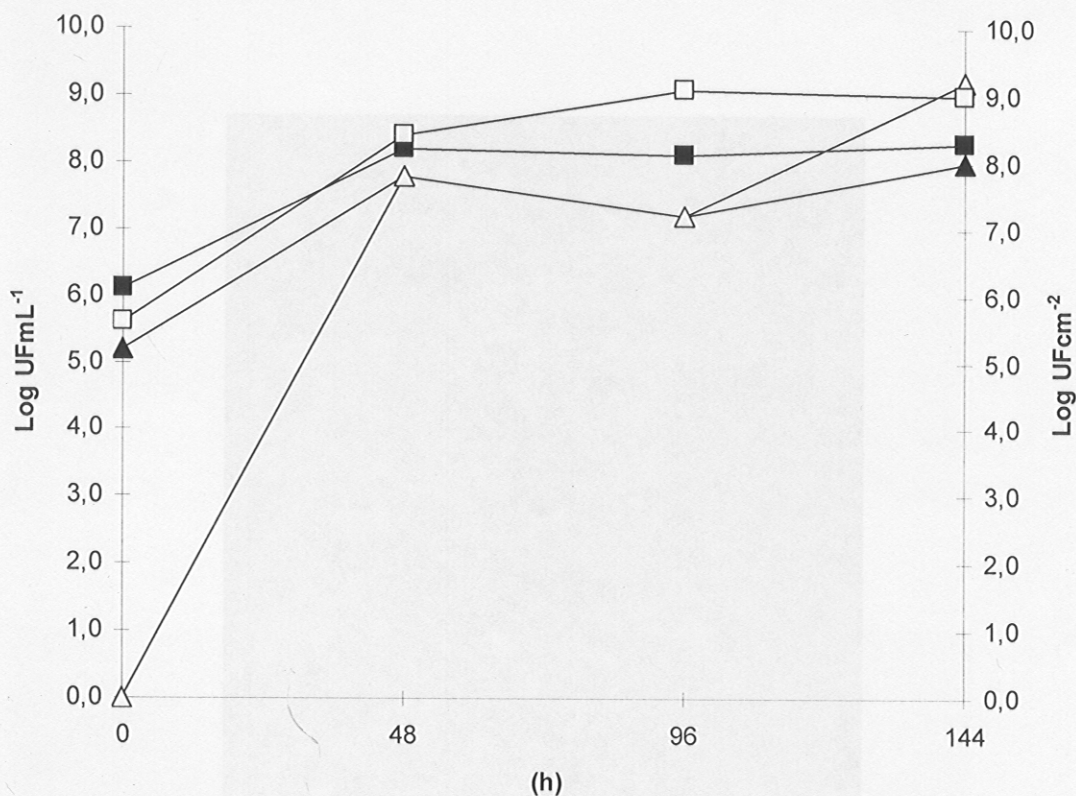


Figura 6 – Logaritmo do número de células viáveis (UFC.mL<sup>-1</sup>) planctônicas em presença de cupons (símbolos fechados) e aderidas (UFC.cm<sup>-2</sup>) (símbolos abertos) de *P. fluorescens* 097, cultivadas em LDR 12% (▲,△) e em TYEP (■,□) 7 °C, sem agitação.

A análise dos cupons de aço inoxidável dos cultivos da mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* corados com laranja de acridina em microscopia de epifluorescência evidenciou que o tratamento com ultra-som, por 30 min, não removeu a totalidade de células aderidas (Figura 7). Foram visualizadas células de *P. fluorescens* aderidas individualmente e distribuídas em monocamadas e aglomerados. Imagens semelhantes foram visualizadas em cupons de cultivos da estirpe 041 após o tratamento com ultra-som.

A observação microscópica de cupons da estirpe 097, cultivada a 22 °C em LDR 12% e TYEP corados com laranja de acridina, confirmou os dados anteriores de maior

adesão. Foram visualizadas monocamadas de células nos cupons removidos minutos após serem imersos nos meios TYEP e LDR 12% inoculados. Em cupons removidos após 24 h de cultivo em LDR 12%, observaram-se, além de monocamadas, aglomerados celulares em multiplanos. Após 120h, encontraram-se campos repletos desses aglomerados.

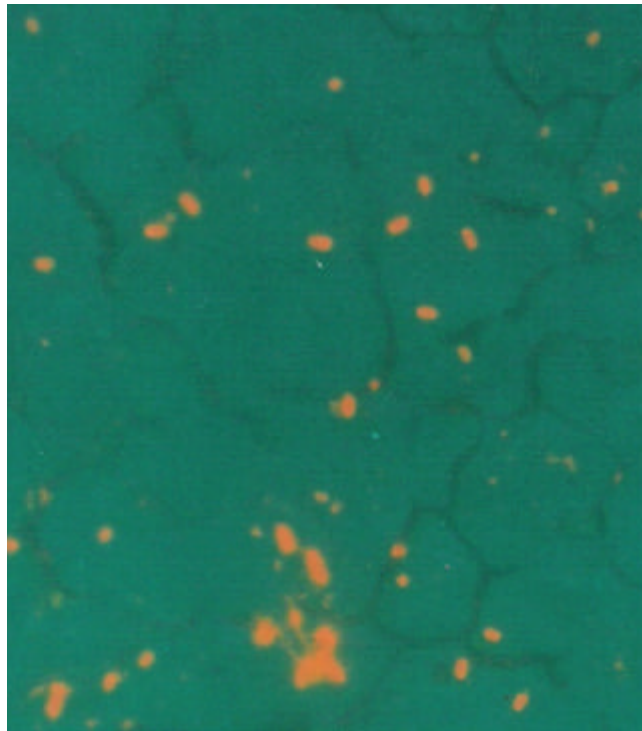


Figura 7 – Observação em microscopia de epifluorescência (aumento de 100 vezes) de células da cultura mista de sete estirpes de *P. fluorescens* aderidas em superfícies de aço inoxidável tipo 304 acabamento # 4, após crescimento em LDR 12% por 120 h, a 22 °C e tratamento dos cupons por ultra-som, por 30 min.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, foi possível confirmar a presença de células das culturas mistas de sete estirpes de *P. fluorescens*, aderidas aos cupons de aço inoxidável após 17 dias de cultivo, mas não se verificou imagem típica de estrutura de biofilmes (Figura 7). Este resultado pode ser explicado, baseando-se nas observações de ALLISON et al. (1998), quanto aos biofilmes de 20 h de incubação apresentarem células bacterianas envelopadas com extensa matrix de exopolímeros.

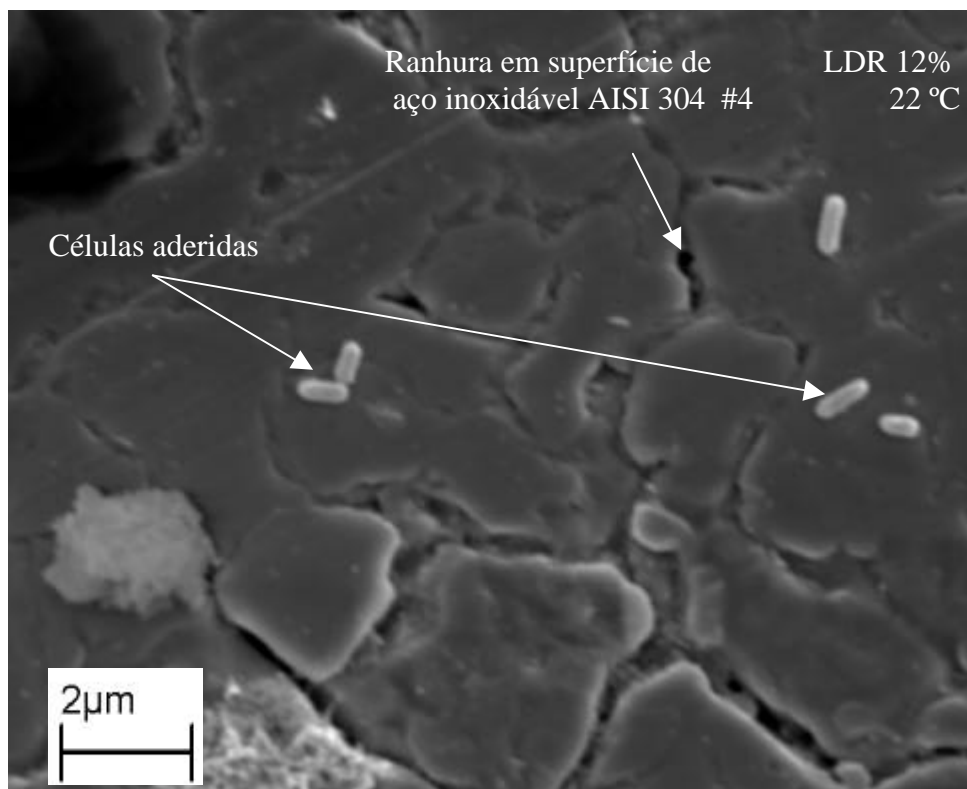
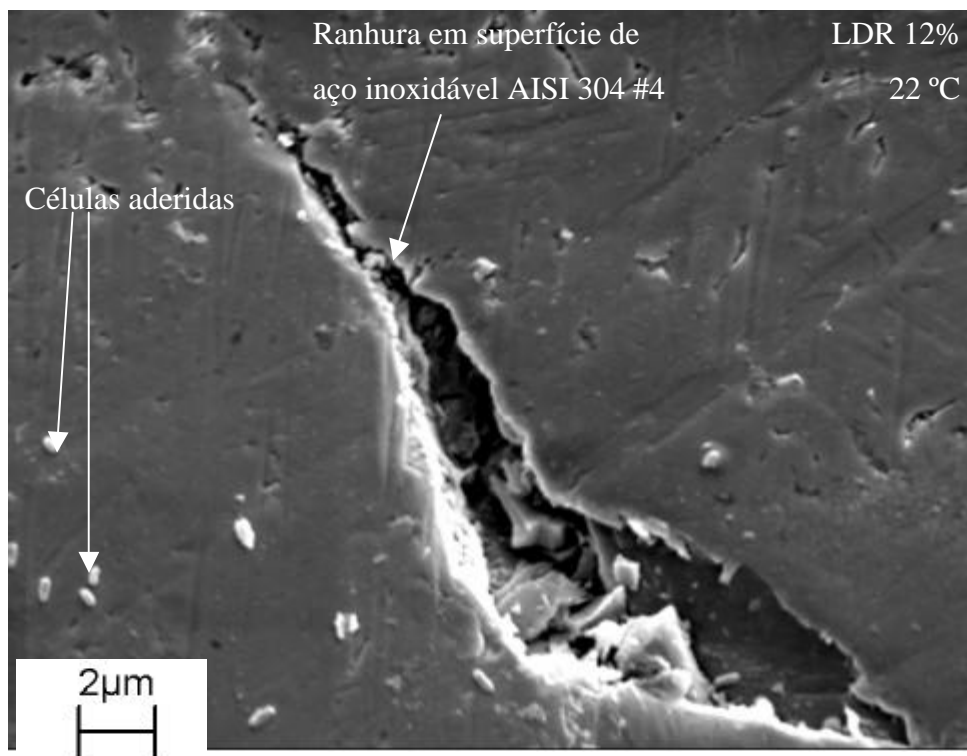


Figura 8 – Microfotografia em microscópio eletrônico de varredura de cupons de aço inoxidável AISI 304 acabamento # 4, removidos após 17 dias de incubação em culturas mistas de sete estirpes de *P. fluorescens* em LDR 12%, a 22 °C, com agitação.

Entretanto, após 60 h de incubação, o biofilme foi substancialmente reduzido e foram observadas imagens claras de células únicas associadas às superfícies, desnudas de exopolissacarídeos.

A ocorrência de adesão de células de *P. fluorescens* nos cupons sugere seu potencial de formação de biofilmes, pois a capacidade de aderência é propriedade fundamental para o desenvolvimento de biofilmes e é favorecida pela motilidade celular (KORBER et al., 1989; O'TOOLE e KOLTER, 1998b). A ocorrência de adesão celular também indica que o condicionamento da superfície pelos substratos utilizados foi adequado e este é um fator fundamental para que os biofilmes sejam formados. Entretanto, o tempo prolongado de 17 dias de incubação adotado, mesmo com trocas periódicas do meio LDR, 12% não foram suficientes para garantir a permanência do biofilme nos cupons observados.

É possível observar, nas Figuras 8 a 10, a topografia irregular do aço inoxidável tipo 304, acabamento # 4, geralmente adotado para construção de equipamentos em indústria de alimentos. A presença de ranhuras, fendas e superfície irregular facilitam a aderência de nutrientes, fator fundamental para o crescimento das células de um biofilme.

Pela Figura 9, pode-se observar as imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura de *P. fluorescens* 041 cultivada em LDR 1% a 7 °C e 22 °C, durante 21 dias. Nas duas situações, observou-se a presença de células aderidas e isoladas, sugerindo que não houve diferença de adesão celular nessas duas temperaturas avaliadas. Essas observações estão de acordo com STONE e ZOTTOLA (1985). Os referidos pesquisadores demonstraram que células de *P. fragi* ATCC 4973 aderiram-se igualmente na superfície de aço inoxidável na presença de LDR, a temperaturas de 4 °C e 25 °C. A adesão iniciou-se após 0,5 h de incubação, à temperatura de 25 °C, e após 2 h a 4 °C. Consideraram que, como houve aumento de adesão ao longo da fase log de crescimento, a idade da cultura, a concentração celular e o tempo têm efeito no número de células aderidas e na quantidade de ligações produzidas pelas células aderidas.

Entretanto, as imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura dos cupons de adesão de *P. fluorescens* 097, após período de incubação de cinco dias, mostraram a presença de grande número de células aderidas, sugerindo presença de exopolímeros, evidenciando a presença de estrutura tridimensional (Figura 10). Esses dados confirmam o maior potencial de formação de biofilmes apresentados por este isolado.

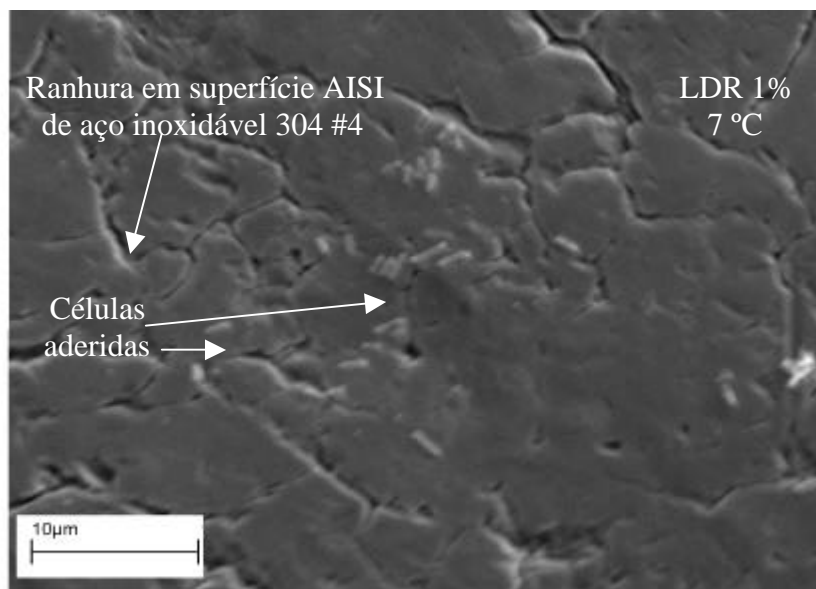
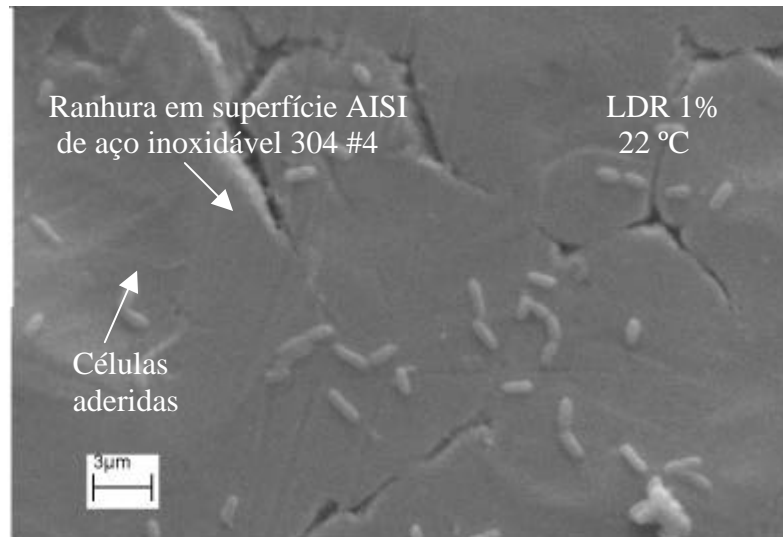


Figura 9 – Microfotografia em microscópio eletrônico de varredura, de células de *P. fluorescens* 041 aderidas em superfície de cupom de aço inoxidável AISI 304 acabamento # 4, cultivadas em LDR 1% durante 21 dias, a 7 °C e 22 °C.

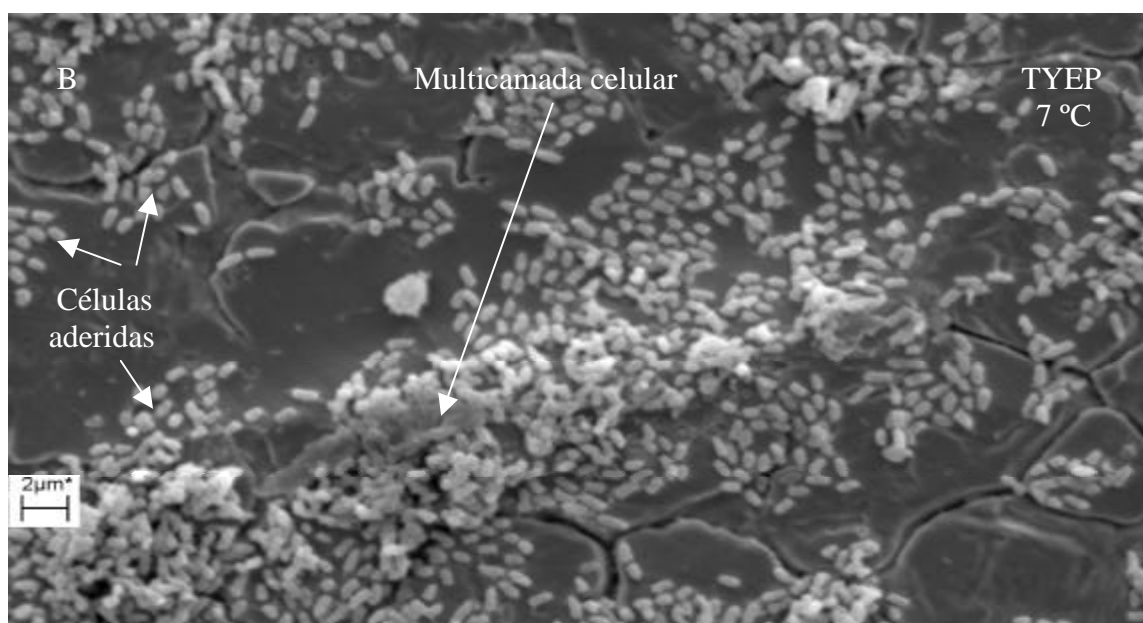
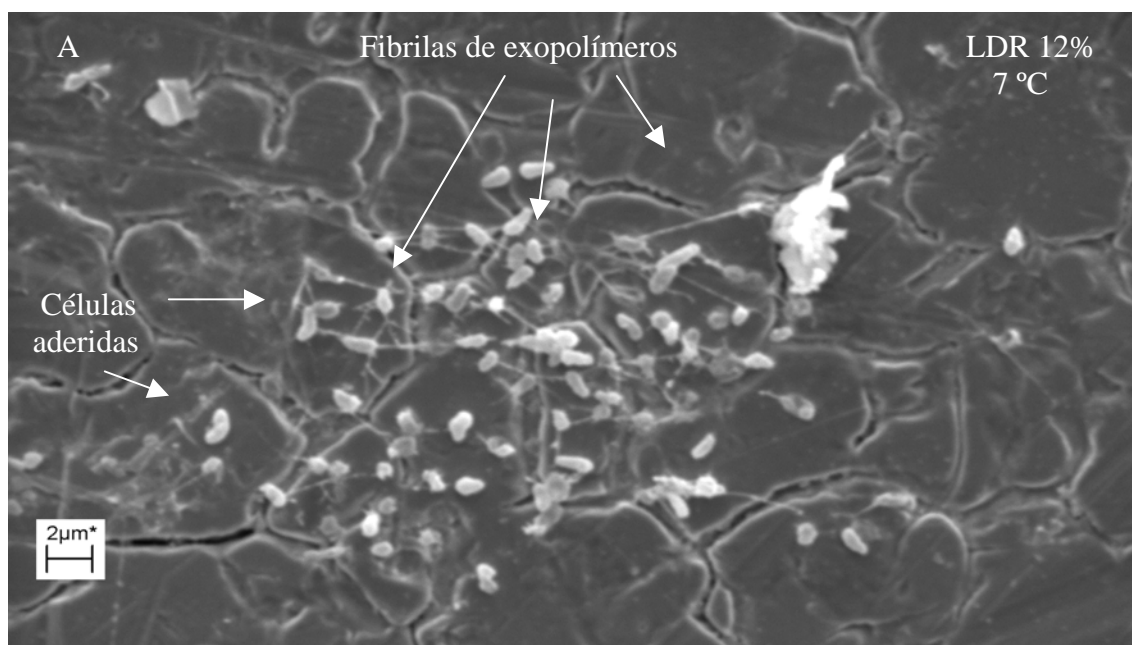


Figura 10 – Células de *P. fluorescens* 097 aderidas em superfície de cupom de aço inoxidável. A) *P. fluorescens* 097 cultivada em LDR 12% a 7 °C, durante cinco dias; B) *P. fluorescens* 097 cultivada em caldo TYEP a 7 °C durante cinco dias.

#### 4.2. Atividade proteolítica de células planctônicas e aderidas de *P. fluorescens*

Nas primeiras 24 h de incubação, a 22 °C, a atividade proteolítica da cultura mista de *P. fluorescens* em fase planctônica em meio LDR 12% atingiu o máximo de 115,0  $\text{Unh}^{-1}\text{mL}^{-1}$  enquanto no LDR 12% contendo células planctônicas e sésseis esta atividade máxima foi de 156,5  $\text{Unh}^{-1}\text{mL}^{-1}$  (Figura 11). Observou-se a tendência de uma maior atividade proteolítica no meio LDR 12%, quando havia células planctônicas e células aderidas aos cupons de aço inoxidável (Figura 11). Esse incremento da atividade proteolítica em razão das células aderidas atingiu valores de até 52% e indicou que células aderidas e, ou em biofilmes, podem secretar enzimas para o meio externo. Na caracterização de biofilmes de *P. fluorescens*, SIMÕES et al. (2005) detectaram uma quantidade de 59,9 mg de proteínas extracelulares por grama de biofilme, enquanto o total de proteínas intracelulares alcançou valores de 150  $\text{mg}^{-1}$  de biofilme.

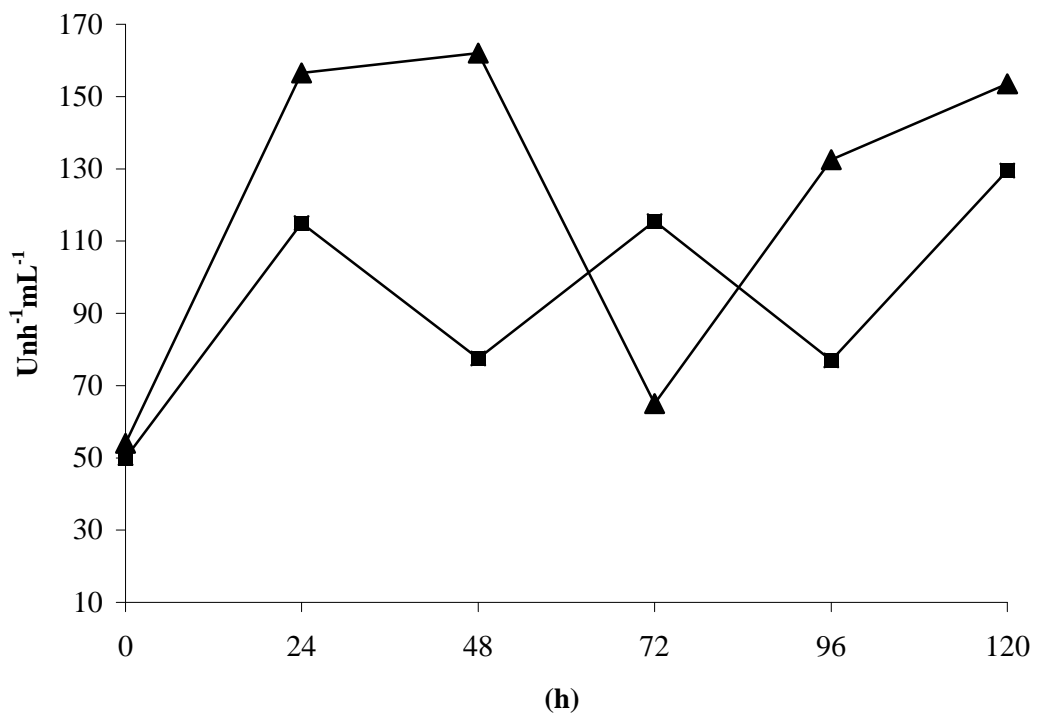


Figura 11 – Atividade proteolítica determinada em LDR 12% inoculado com mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* na presença (▲) e ausência (■) de cupons de aço inoxidável AISI 304 acabamento # 4, com células aderidas e incubadas a 22 °C, com agitação de 140 rpm.

Também em outras bactérias em biofilmes, a constatação de atividade de proteases extracelulares já havia sido realizada. Células aderidas de espécies mesofílicas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus*, isoladas de indústrias de laticínios, produziram enzimas proteolíticas (LINDSAY et al., 2000). OKADAK e TRAFNY (2005) verificaram que células de *P. aeruginosa* em biofilmes formados em superfícies de membranas Millipore® suspensas em meio nutriente e tratadas com ciprofloxacina secretaram proteases para o meio externo. Pode-se sugerir que biofilmes formados em superfícies de equipamentos da indústria e laticínios contribuem para o aumento da atividade proteolítica associada à deterioração do leite e produtos lácteos.

A atividade proteolítica de *P. fluorescens* 041 incubada a 22 °C foi sempre maior em LDR 1%, com valores máximos de 118,75 Unh<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup>, enquanto, em caldo TYEP, o máximo de atividade proteolítica registrado foi de 27,5 Unh<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup> (Figura 12). Resultados diferentes foram obtidos por MALIK et al. (1985) que constataram que o caldo TYEP apresentou efeito estimulante da produção de protease por *Pseudomonas* sp. B25. O extrato de levedura e os sais inorgânicos, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, acrescentados ao meio básico de triptona, foram os compostos responsáveis por esse efeito. PINTO (2005) verificou maior atividade proteolítica em culturas de *P. fluorescens* 07A, isolada de leite cru refrigerado em caldo TYEP, quando íons cálcio foram incorporados ao meio de cultura. Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que TYEP foi promotor de multiplicação celular, mas não da atividade proteolítica de *P. fluorescens* 041. Efeito semelhante foi obtido por MAYERHOFER et al. (1973) com caldo de extrato de carne, triptona e glicose, quando comparado aos meios BHI, tripticaseína de soja e caldo nutriente. As proteases de *Pseudomonas* contêm, na sua estrutura química, íons cálcio e sua secreção e atividade são estimuladas na presença deste íon (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; LIAO e McCALLUS, 1998). A presença de cálcio no leite pode ser a explicação para a maior atividade proteolítica de *P. fluorescens* 041, observada em LDR 1% que em TYEP. McKELLAR e CHOLETTE (1984) demonstraram que sobrenadante de leite desnatado, ácido solúvel, estimulou a síntese de protease de *P. fluorescens* em maior intensidade que o mesmo material dialisado. Esses pesquisadores concluíram que moléculas de leite de baixo peso molecular dialisáveis têm papel na indução da produção de protease por *P. fluorescens*. NICODÈME et al. (2005) avaliaram a influência de condições de cultivo na produção de proteases por estirpes de *Pseudomonas*. Esses autores demonstraram que o acréscimo de 1% de leite desnatado

ao meio mínimo de sais, em cultivos a 25 °C, aumentou a atividade proteolítica de *P. fluorescens* em aproximadamente 10 vezes, o que representou efeito ligeiramente mais alto que a suplementação com 2% de CaCl<sub>2</sub>. Após 24 h em TYEP e LDR1%, a 22 °C, a população de células de *P. fluorescens* 041 atingiu fase estacionária de crescimento mantendo-se aproximadamente em 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3). Em LDR 1%, essa fase estendeu-se até 120 h de cultivo, coincidindo com fase de aumento da atividade proteolítica (Figura 12). Tem sido demonstrado que produção de proteases ocorre ao final de fase exponencial e permanece ao longo da fase estacionária de crescimento (GRIFFITHS, 1989; RAJMOHAN et al., 2002; NICODÈME et al., 2005).

A presença de cupons de aço inoxidável contendo células aderidas de *P. fluorescens* 041 não alterou a atividade proteolítica no sobrenadante dos meios TYEP ou LDR 1% durante o período de incubação a 22 °C (Figura 12). Resultados anteriores (Figura 3) evidenciaram que essa estirpe apresentou baixo potencial para adesão, pois o número de células aderidas em cupons de aço inoxidável diminuiu após 48 h de incubação em TYEP e após 96 em LDR 1%, mantendo-se abaixo de 10<sup>7</sup> UFC.cm<sup>-2</sup>. Segundo determinado por PINTO (2004), a atividade proteolítica dessa estirpe foi detectada, quando a população de células está acima de 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, o que está de acordo com GRIFFITHS (1989), referindo-se a bactérias psicrotólicas em leite. Isto sugere a possibilidade de que a ausência de alteração da atividade proteolítica no sobrenadante do meio LDR 1%, durante o período de incubação a 22 °C, pelas células aderidas, não seja real e sim decorrência da técnica de dosagem. Conforme consideraram SPECK e ADAMS (1976), é difícil detectar baixas concentrações de protease em leite, e é necessário o desenvolvimento de procedimentos mais sensíveis. As metodologias disponíveis são, portanto, imprecisas, o que significa que uma dosagem com resultados negativos não corresponde, necessariamente, a ausência de proteases bacterianas nas amostras de leite em análise. Para controle da qualidade do leite e previsão de vida de prateleira, os métodos imunológicos de pesquisa celular podem ser mais precisos.

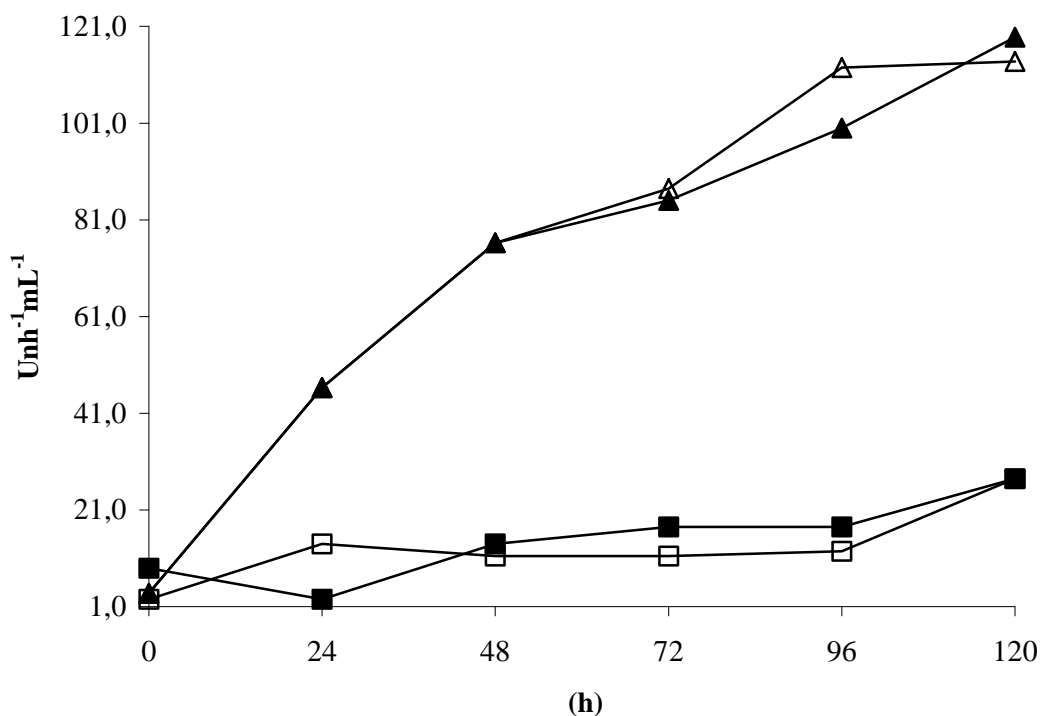


Figura 12 – Atividade proteolítica de *P. fluorescens* 041 cultivada em TYEP ( , ) e LDR 1% ( , ) a 22 °C, sem agitação, na presença (símbolos abertos) ou ausência (símbolos fechados) de cupons de aço inoxidável para adesão celular.

Quando incubada a 7 °C, a atividade proteolítica de *P. fluorescens* 041 foi também maior em LDR 1%, alcançando o máximo de 98,8  $\text{Unh}^{-1}\text{mL}^{-1}$  após 144 h de incubação (Figura 13). Essa atividade proteolítica representou 83% da atividade máxima encontrada a 22 °C, neste mesmo meio de cultura. Esse resultado reforça as observações de que quantidades elevadas de enzimas proteolíticas de *P. fluorescens* são produzidas mesmo a temperaturas baixas (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

Não se detectou relação direta entre a concentração de células planctônicas ou aderidas de *P. fluorescens* 041 e atividade proteolítica, mas pode-se inferir que as células apresentaram aumento de atividade proteolítica específica. A cada 24 h de incubação a 22 °C, e a cada 48 h a 7 °C, o meio de cultura foi renovado e, mesmo assim, observou-se um aumento da atividade proteolítica ao longo do tempo de incubação em LDR 1% (Figuras 12 e 13).

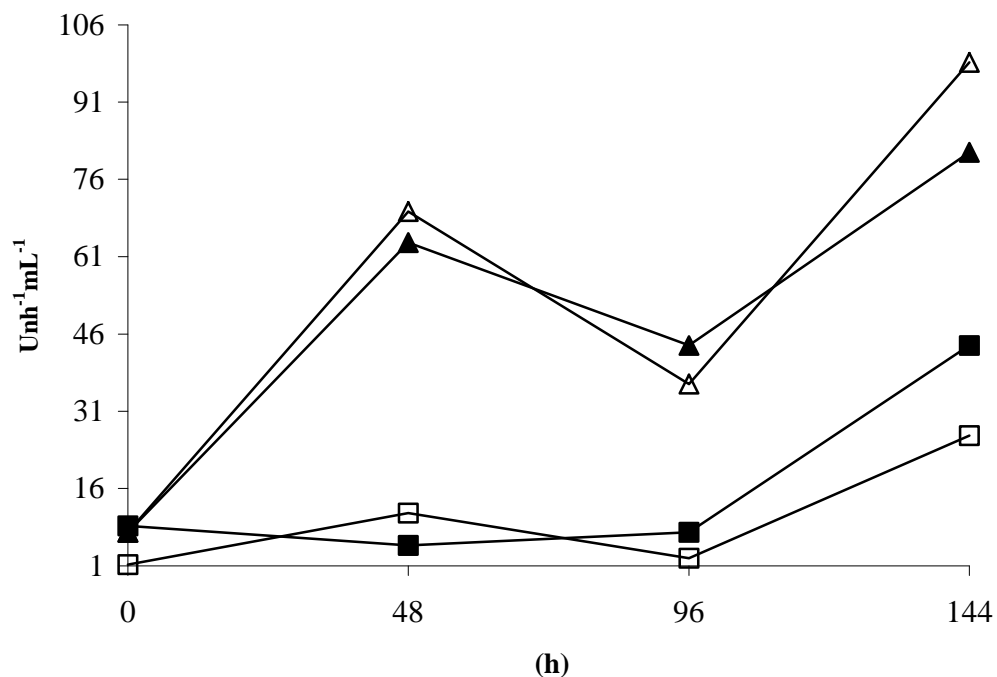


Figura 13 – Atividade proteolítica de *P. fluorescens* 041 cultivada em TYEP ( , ) e LDR 1% ( , ) a 7 °C, sem agitação, na presença (símbolos abertos) ou ausência (símbolos fechados) de cupons de aço inoxidável para adesão celular.

A atividade proteolítica de *P. fluorescens* 097 não foi maior em LDR 12% do que em caldo TYEP, a 22 °C e o valor máximo alcançado foi de 78,8  $\text{Unh}^{-1}\text{mL}^{-1}$  (Figura 14). Esta atividade proteolítica máxima foi inferior à atividade máxima encontrada no sobrenadante do LDR 12% proveniente da cultura mista das sete estirpes de *P. fluorescens* como também das amostras de LDR 1%, cultivadas com *P. fluorescens* 041.

O abaixamento da temperatura de incubação para 7 °C promoveu uma redução substancial na atividade proteolítica de *P. fluorescens* 097 que foi maior na presença de LDR 12% do que em TYEP e alcançou valores máximos de 15,6  $\text{Unh}^{-1}\text{mL}^{-1}$  (Figura 15).

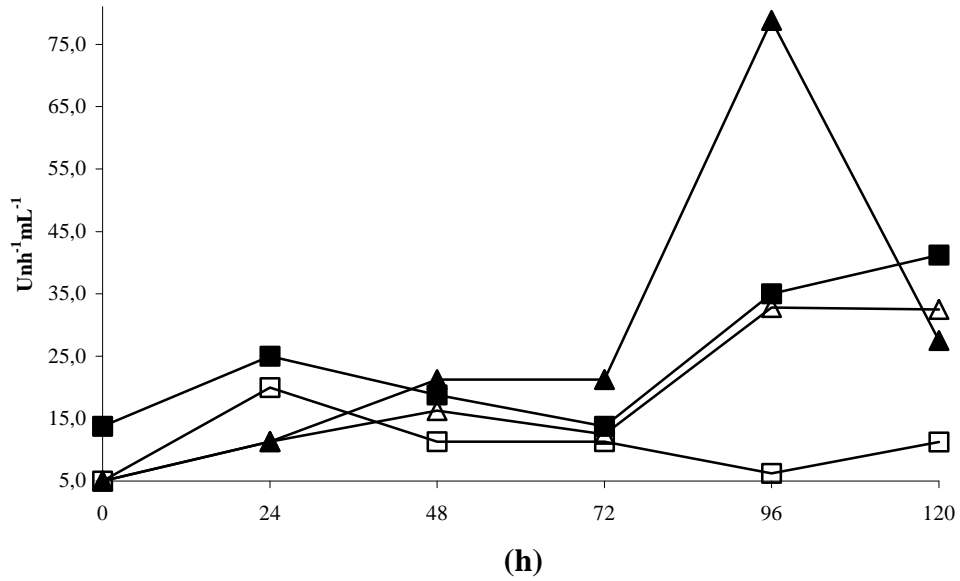


Figura 14 – Atividade proteolítica de *P. fluorescens* 097 cultivada em TYEP ( , ) e LDR 12% ( , ) a 22 °C, sem agitação, na presença (símbolos abertos) ou ausência (símbolos fechados) de cupons de aço inoxidável para adesão celular.

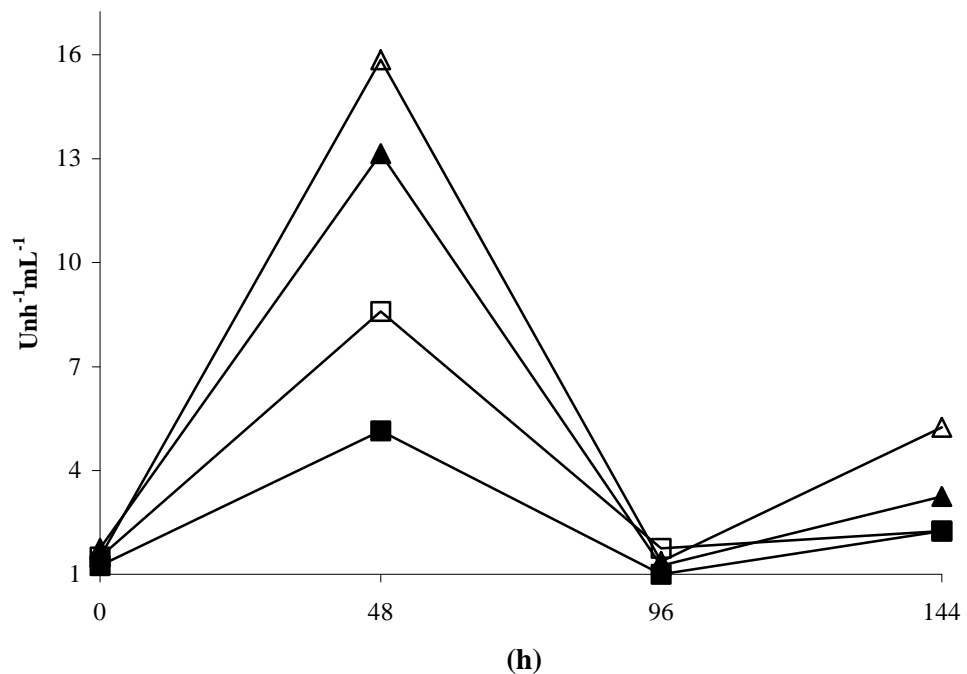


Figura 15 – Atividade proteolítica de *P. fluorescens* 097 cultivada em TYEP ( , ) e LDR 12% ( , ) a 7 °C, sem agitação, na presença (símbolos abertos) ou ausência (símbolos fechados) de cupons de aço inoxidável para adesão celular.

### **4.3. Produção de anticorpos policlonais contra *P. fluorescens***

Em todos os anti-soros coletados 10 dias após a segunda aplicação de imunógenos, constatou-se a ocorrência de anticorpos contra os respectivos imunógenos e contra cada uma das respectivas estirpes de *P. fluorescens* constituintes.

Houve variação nas reações de um mesmo anti-soro com a mistura de antígenos e com as diferentes estirpes componentes de um mesmo antígeno. Os títulos dos anti-soros que interagiram com um número mínimo de células, dos diferentes antígenos, variaram de 8 a 128. A detecção de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de antígenos foi freqüente e ocorreu com anti-soros em títulos de 4 a 128. Os anti-soros 2A e 2C apresentaram títulos de 8 e 16 em interações com  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> dos antígenos 0123 e 041, respectivamente. Este resultado é semelhante a dados da literatura. GONZÁLEZ et al. (1994) verificaram que o anti-soro policlonal contendo anticorpos contra *P. fluorescens* AH-70 apresentou sensibilidade para detectar  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.3.1. Titulação dos anti-soros obtidos pela técnica de aglutinação em gota**

As reações antígeno-anticorpo (Ag-Ac) conduzidas pela técnica de aglutinação em gota foram favorecidas pela temperatura de 37 °C e as leituras foram feitas após 2 a 5 h de reação. Leituras duvidosas foram repetidas após 24 h e as mudanças observadas foram esporádicas.

Todos os anti-soros obtidos interagiram com os antígenos correspondentes em concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, embora o maior título de cada anti-soro com reação positiva a antígenos, nesta concentração celular, tenha sido muito variado (Quadro 2).

Os três anti-soros obtidos em resposta ao imunógeno 1 (anti-soros 1A, 1B e 1C), interagiram com antígenos das estirpes 07A, 033 e com antígeno composto por essas estirpes, nessa concentração celular, pelo menos em título de 8. No entanto, houve interação de AS 1A e 1B em título de 32 com os antígenos 033 e 07A respectivamente, o que correspondeu ao maior título dos anti-soros em resposta ao imunógeno 1 (Quadro 2).

Quadro 2 – Título de cada anti-soro obtido, determinado pela técnica de aglutinação em gota, em interação com antígenos em concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>

<b>Antígenos em concentração de <math>10^8</math> UFC.mL<sup>-1</sup></b>	<b>Anti-soros</b>	<b>Títulos dos anti-soros</b>
07 <sup>a</sup>	1A	16
033		32
01		16
07 <sup>a</sup>	1B	32
033		16
01		16
07 <sup>a</sup>	1C	16
033		8
01		16
041	2A	32
096		00
0123		4
02		64
041	2B	8192
096		1024
0123		8
02		32
041	2C	64
096		8
0123		4
02		64
077	3A	512
0141		256
03		64
077	3B	512
0141		256
03		512
077	3C	512
0141		128
03		256

A faixa de títulos dos anti-soros, com reações positivas aos antígenos individuais do imunógeno 2 e sua composição, foi ampla e variou de 4 a 8192 (Quadro 2). O anti-soro 2A não foi reativo com o antígeno representado por *P. fluorescens* 096 e seu maior título foi 64, na interação com o antígeno composto por todas as estirpes do imunógeno 2, assim como o AS 2C. Esses resultados permitem considerá-los possuidores de título baixo. O anti-soro com maior sensibilidade para com os antígenos constituídos pelas estirpes individuais do imunógeno 2 foi o AS 2B, apresentando seu menor título em 8 e o maior em 8129 (Quadro 2).

A resposta imunológica dos três animais desafiados com o imunógeno 3, constituído pelas estirpes 077 e 0141, resultou em anti-soros altamente reativos, excetuando-se apenas a reação do anti-soro 3A com o antígeno 03, com título de 64 (Quadro 2).

Estes resultados de reações por aglutinação em gota sugerem que há diferenças individuais dos organismos nas respostas imunológicas, bem como diferenças no potencial imunogênico entre as estirpes de uma mesma espécie bacteriana. CANDLISH (1991) considerou que a preparação de anticorpos policlonais é simples, envolvendo aplicação de imunógenos em vários animais, mas que a produção de anti-soros não é uniforme entre eles.

Reações de aglutinação em gota com antígenos em concentração celular de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram positivas entre o anti-soro 2B não-diluído e os antígenos composto pelas três estirpes de imunógeno 2 e os constituídos por cada estirpe, 041 e 096. Os anti-soros 1B, 2A e 2C foram capazes de detectar células dos antígenos dos imunógenos correspondentes em concentração de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, no entanto, a especificidade foi diferente. O anti-soro 1B em título 8 detectou apenas *P. fluorescens* 07A, enquanto o anti-soro 2A interagiu de forma mais ampla, e em títulos de 8 e 16 detectou, respectivamente, o antígeno composto pelas três estirpes correspondentes ao imunógeno 2 e a estirpe 041. O anti-soro 2C em título 8 interagiu com o antígeno composto pelas três estirpes do imunógeno 2.

Pela técnica de aglutinação em gota não foi possível a detecção de antígenos em concentração celular de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Resultados obtidos por GONZÁLEZ et al. (1994) com anti-soro policlonal contra proteína F de membrana externa de *P. fluorescens* AH70, também, detectaram um mínimo de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> em amostras de leite inoculado com o antígeno. A detecção de números baixos de células de

*P. fluorescens* e de outros psicrotróficos proteolíticos em leite cru, por métodos rápidos, precisos e sensíveis, é de grande interesse da indústria, para a adoção de medidas preventivas, que garantam a qualidade dos produtos lácteos.

#### 4.3.2. Titulação dos anti-soros obtidos pela técnica de imunodifusão dupla

A titulação dos anti-soros obtidos pela técnica de imunodifusão dupla (IDD) com antígenos solubilizados em fervura resultou em ausência de interação entre os anti-soros 1A, 1B e 1C e os antígenos correspondentes ao imunógeno 1.

O mesmo ocorreu entre os anti-soros 2A, 2B e 2C e o antígeno da estirpe 096 e o antígeno de composição correspondente ao imunógeno 2. Anti-soro 2B interagiu, em títulos de 8 e 2048, com antígenos das estirpes 041 e 0123, respectivamente, em concentrações equivalentes a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O anti-soro 2C, com o título de 32, interagiu com o antígeno representado por *P. fluorescens* 0123 em concentração equivalente a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Os anti-soros 3A e 3B apresentaram, nas reações de IDD, título de 8 com o *P. fluorescens* 03 e 077. Melhores resultados foram obtidos com o anti-soro 3C que interagiu com o Ag 077 com o título de 2048 e com Ag 03, com o título de 4096.

Reações com antígenos em concentrações equivalentes a  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram todas negativas.

As reações pela técnica de IDD, utilizando-se antígenos solubilizados por pressurização, foram positivas com os anti-soros nas diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 (Quadro 3). Predominaram reações positivas em concentrações de antígenos equivalentes a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e ocorreram algumas em  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Todas as reações com antígenos em concentração equivalente a  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram negativas. Em razão da ocorrência aleatória de reações positivas e negativas com os diferentes antígenos, não foi possível avaliar se o antígeno na forma integral, sobrenadante, ou precipitado favorece a sensibilidade dos testes. Exemplos de reações entre antígenos preparados com *P. fluorescens* 07A e os anti-soros 1A, 1B e 1C são apresentados no Quadro 3, considerando-se apenas as séries nas quais houve positividade. O aumento da sensibilidade na imunodeteção de *P. fluorescens* por ELISA foi observado por GONZÁLEZ et al. (1994), quando utilizaram células bacterianas rompidas por sonicação e compararam com a detecção de células intactas.

Quadro 3 – Resultado de reações de imunodifusão dupla entre antígeno 07A solubilizado por pressurização e anti-soros 1A, 1B e 1C

Anti-soros	Apresentação do antígeno 07A	Equivalência em UFC.mL <sup>-1</sup>	Títulos dos anti-soros					Reações de Ag x AS*
			2	4	8	16	32	
1A	Sobrenadante	10 <sup>7</sup>	+	-	-	-	-	+
		10 <sup>8</sup>	+	+	-	-	-	+
	Precipitado	10 <sup>7</sup>	+	-	-	-	-	+
		10 <sup>8</sup>	+	-	-	-	-	+
1B	Integral	10 <sup>8</sup>	-	-	+	-	-	-
1C	Integral	10 <sup>5</sup>	-	+	+	-	-	-
		10 <sup>7</sup>	-	-	-	+	-	+
		10 <sup>8</sup>	-	-	-	+	+	+
		10 <sup>8</sup>	-	-	-	+	+	+

\*Anti-soro não-diluído.

#### 4.3.3. Titulação dos anti-soros obtidos pela técnica de imunodot-blot

As reações pela técnica de imunodot-blot entre *P. fluorescens* 077 em concentração inicial de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> e diluída em 1/2 a 1/32 com anti-soros diluídos em 1/10, foram positivas. Testes adicionais evidenciaram que esta positividade foi mantida em reações com antígenos de concentrações celulares de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e anti-soro diluído entre 1/10 a 1/160. Não foram observadas reações, quando as concentrações iniciais de antígenos eram 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Dentre as técnicas aplicadas na titulação dos anti-soros obtidos, aglutinação em gota e imunodot-blot foram as mais sensíveis, detectando antígenos em concentração de 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Não foi possível determinar o título para cada um dos anti-soros. Houve diferenças de sensibilidade de um mesmo anti-soro para diferentes antígenos correspondentes a um mesmo imunógeno. No entanto, observou-se que, pela técnica de aglutinação em gota, o menor título de anti-soros em interação com antígenos de composição correspondente a cada um dos três imunógenos, foi 16 (Quadro 2), sugerindo que se pode trabalhar com anti-soros desconhecidos em diluição 1/10.

#### 4. 4. Detecção de *P. fluorescens* em LDR 12%

##### 4.4.1. Detecção de *P. fluorescens* em LDR 12% pela técnica de aglutinação em gota

Os anti-soros 1A, 1B, e 1C apresentaram sensibilidade para detectar populações de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, constituídas por uma mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* cultivadas em LDR 12%, em diluição de pelo menos 1/8. (Quadro 4).

Os anti-soros 2A, 2B e 2C também detectaram populações da cultura mista de sete estirpes de *P. fluorescens* entre  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em diluição mínima de 1/16, mas apresentaram sensibilidade diferenciada. Dentre esses três anti-soros, o 2A mostrou-se mais sensível e com título de 256 interagiu com o número mínimo de células avaliado, que foi de  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> (Quadro 4).

Os anti-soros 3A, 3B e 3C interagiram com os antígenos em todas as concentrações celulares. O mais sensível deles foi o 3B que detectou concentração de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> da mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* em título de 32 e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em título de 128 (Quadro 4).

Quadro 4 – Reações de aglutinação em gota entre anti-soros 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B e 3C e a mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* cultivada a 22 °C em LDR 12%

Concentrações celulares de antígenos (UFC mL <sup>-1</sup> )	Anti-soros e respectivos títulos								
	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
$10^3$	16	-*	8	256	32	16	16	32	8
$10^5$	16	8	16	256	256	16	16	16	16
$10^6$	8	8	32	128	256	16	16	16	16
$10^7$	16	16	64	128	256	16	16	16	8
$10^8$	16	16	64	512	256	32	64	128	32

\* ausência de reação.

A estirpe de *P. fluorescens* 097 não era componente dos imunógenos, mas a sua detecção pelos anti-soros obtidos foi avaliada. Populações contendo  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> dessa bactéria não foram detectadas pelos anti-soros 2A, 2B, 3A e 3B, selecionados anteriormente, como os mais sensíveis. Os anti-soros 2B e 3A detectaram *P. fluorescens* 097 apenas na concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> até a diluição 1/16. Esse resultado indica a ocorrência de determinantes antigênicos comuns entre as estirpes de *P. fluorescens*.

O imunógeno 2 era constituído de três estirpes de *P. fluorescens*, tendo a chance de ser mais rico em diversidade de determinantes antigênicos. Em consequência, os anti-soros 2A e 2B interagiram em títulos mais altos com todas as concentrações de células antigênicas em LDR 12%. Anti-soro 2C teve seus títulos menores que os dois anteriores, confirmando-se as diferenças individuais de capacidade de resposta imunológica entre os animais. A redução dos títulos dos anti-soros 3A, 3B e 3C, comparando-se com os apresentados em fase de titulação dos anti-soros (Quadro 2), sugeriu a possibilidade de fenótipos diferentes pelas estirpes de *P. fluorescens* em BHI e LDR 12%.

A maior sensibilidade dos anti-soros 2 foi confirmada, quando três amostras de leite cru, armazenadas sob refrigeração, foram testadas pela técnica de aglutinação em gota com os anti-soros 2A, 2B, 3A e 3B. Interações positivas foram observadas entre o anti-soro 2B em título de 64 e duas amostras do leite cru. O resultado sinaliza possível aplicação de uma técnica simples e rápida na detecção direta de *P. fluorescens* em amostras de leite *in natura*.

De acordo com ALLEN e SMITH (1987), anti-soros monoclonais ou policlonais têm as mesmas vantagens em análises de alimentos e podem ser escolhidos segundo critérios de performance e custos. Para maior abrangência de sensibilidade, anti-soros policlonais seriam mais adequados. A purificação de imunoglobulinas dos anti-soros elimina anticorpos não-específicos, que podem determinar reações falso-positivas (CANDLISH, 1991).

#### **4.4.2. Detecção de *P. fluorescens* em LDR 12% pela técnica de imunodot-blot**

Reações de imunodot-blot entre anti-soros 1A, 1B e 1C nas diluições de 1/10 a 1/160 e a mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* cultivadas em LDR 12% a 22 °C

foram positivas em concentrações celulares de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 16). Reações positivas ocorreram também entre o anti-soro 1A com título de 20 e o anti-soro 1B com título de 40, 80 e 160, quando a mistura de *P. fluorescens* estava em concentração de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A detecção de *P. fluorescens* em número abaixo do necessário para comprometer qualidade de leite pelo acúmulo de enzimas hidrolíticas, como populações de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, sugere o potencial da metodologia para o controle da qualidade na indústria laticinista. A produção elaborada de anti-soros por meio da seleção de antígenos de superfície de *P. fluorescens* aliada à produção de anticorpos monoclonais, certamente, promoveria aumento de sensibilidade dos anti-soros e da capacidade de detecção das células, por esta técnica imunológica.

Anti-soro 2B em título de 40 interagiu com a mistura de *P. fluorescens* na concentração celular de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e o anti-soro 3B detectou a mistura de *P. fluorescens* nas concentrações acima de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Os anti-soros 1A, 1B, 1C, 2B e 3B detectaram a estirpe de *P. fluorescens* 097, não constituinte dos imunógenos aplicados nos animais, em concentração celular de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, mas não nas concentrações de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> avaliadas. Esse resultado indica a presença de antígenos comuns nessas estirpes, o que concorda com GONZÁLEZ et al. (1996) que afirmaram que células de bactérias Gram-negativas têm proteínas de membrana externa que são antígenos comuns a gêneros, ou a espécies, o que facilitaria a obtenção de anti-soros com capacidade ampla de ligação.

A amplificação da sensibilidade de anti-soros pode ser obtida por meio da elaboração de imunógenos compostos. MATTA e PUNJ (2000) utilizaram essa estratégia elaborando imunógeno a partir de mistura de diferentes proteases de *Bacillus* sp., ampliando a sensibilidade de anti-soro para a técnica de ELISA. A mistura de anticorpos monoclonais é outra alternativa e tem sido utilizada na detecção imunológica de *Salmonella* (CANDLISH, 1991). A utilização de antígenos celulares de psicrotóxicos Gram-negativos é, portanto, considerada promissora na detecção da presença dessas células em alimentos.

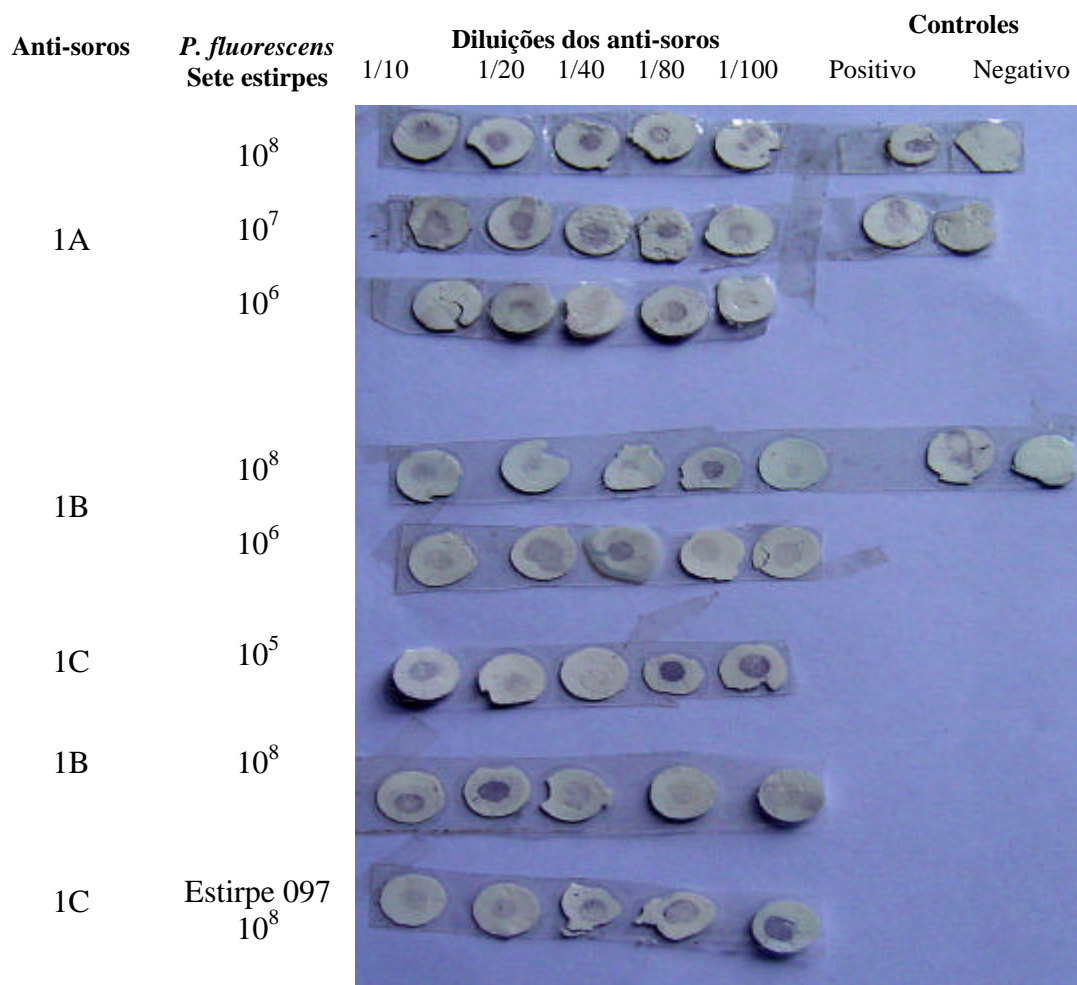


Figura 16 – Reações de imunodot-blot da mistura de sete estirpes de *P. fluorescens* e *P. fluorescens* 097 (H) cultivadas em LDR 12% a 22 °C e anti-soros obtidos de coelhos contra imunógenos 1.

Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para indicar se os antígenos obtidos de células de *P. fluorescens* proteolíticas detectariam a ocorrência dessa categoria de microrganismos deterioradores, na amostra analisada. A detecção desses antígenos, em concentrações de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> pelas técnicas de aglutinação em gota e imunodot-blot, sugere que essas metodologias podem ser instrumentos de prevenção de deterioração de leite. Embora alguns autores relatem que não há relação direta entre número de células de psicrotóxicos e concentração de proteases presentes em leite (JUFFS, 1973; ADAMS et al., 1976; PICARD et al., 1994; MUIR, 1996a), é importante que a população produtora de protease termorresistente permaneça em número baixo no leite cru (HARYANI et al., 2003).

#### **4.4.3. Reação cruzada dos anticorpos policlonais contra *P. fluorescens***

A detecção de outras espécies bacterianas, como *Aeromonas* 099, *Burkholderia pseudomallei* 056, *Chryseomonas* 0145, *Providencia stuartii* 051 e *Pseudomonas putida* 013, Gram-negativas proteolíticas e isoladas de leite cru (PINTO, 2004), em concentrações de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, foi feita por aglutinação em gota com os anti-soros 2A, 2B, 3A, 3B e 3C diluídos entre 1/2 a 1/4096. Reações positivas ocorreram apenas com *Aeromonas* 099 e os anti-soros 2A e 3A na diluição 1/4. *Aeromonas* são bacilos ou cocobacilos Gram-negativos produtores de grandes quantidades de enzimas extracelulares (VENEGONI et al., 2006).

A reação cruzada dos anti-soros 2A e 3A com *Aeromonas* 099 indicou a existência de antígenos comuns a esses gêneros, *Pseudomonas* e *Aeromonas*. GONZÁLEZ et al. (1996) detectaram antígenos de superfície celular comuns em espécies e gêneros de Gram-negativas. Esses resultados sugerem a possibilidade de utilização de células de *P. fluorescens* altamente proteolíticas, para preparação de imunógenos, para a obtenção de anti-soros, de sensibilidade ampla, o bastante, para indicar a ocorrência de outras bactérias Gram-negativas comprometedoras da qualidade do leite.

A detecção de *P. fluorescens* em LDR 12% em concentração celular de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, obtida com o anti-soro 2A, sugere a perspectiva de atendimento ao objetivo do presente trabalho que se constitui na detecção da ocorrência desses

microrganismos, antes que atinjam uma população numericamente deterioradora daquele produto.

As técnicas de aglutinação em gota e imunodot-blot, dentre as técnicas imunológicas utilizadas neste estudo, foram as mais sensíveis, detectando presença de antígenos em concentrações celulares tão baixas quanto  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e foram também as técnicas menos laboriosas. Estas não exigem o tratamento de dissolução dos antígenos, restringindo-se à lavagem do material a ser pesquisado. Pelos resultados obtidos, pode-se considerar que, em termos de sensibilidade, as duas técnicas igualaram-se. Observou-se, no entanto, que a análise dos resultados da técnica de aglutinação em gota é mais susceptível a erros. A intensidade de aglutinação é naturalmente variável, em função das quantidades e proporções de Ag e Ac. Reações positivas muito brandas podem ser facilmente despercebidas. Em imunodot-blot a revelação das reações Ag-Ac faz-se pela cor. O desenvolvimento dessa cor é condicionado à reação entre anticorpo primário e o antígeno pesquisado, independente das concentrações desses elementos. Portanto, há necessidade de maior treinamento para leituras seguras das reações de aglutinação em gota, auxiliadas por equipamentos como microscópio estereoscópio, do que para as reações de imunodot-blot, que podem ser vistas sem ajuda de equipamentos.

## 5. CONCLUSÕES

Estirpes de *P. fluorescens* isoladas de leite cru refrigerado foram avaliadas quanto à capacidade de adesão e desenvolvimento de biofilmes na superfície de cupons de aço inoxidável a 7 °C e 22 °C, imersos em LDR 12% e TYEP. Culturas mistas constituídas de sete estirpes de *P. fluorescens*, cultivadas em LDR 12% a 22 °C alcançaram valores máximos de  $10^8$  UFC.cm<sup>-2</sup> de células planctônicas e aderidas. Observações em microscópio eletrônico de varredura dos cupons com cultivos de 21 dias dessas estirpes não permitiram a visualização da estrutura de biofilmes. Em culturas puras das estirpes 041 e 097 de *P. fluorescens* em TYEP e LDR 1% ou 12%, a 7 °C e a 22°C, observou-se comportamento diferente. *P. fluorescens* 041 apresentou número máximo de células aderidas de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, mas que variou ao longo do período de incubação, sugerindo um desprendimento das células da superfície abiótica. A 7 °C, o caldo TYEP promoveu maior adesão dessa estirpe que o LDR 1%, e este resultado indica que, a essa temperatura, a presença de nutrientes afetou a adesão celular.

*P. fluorescens* 097 destacou-se pela capacidade elevada de adesão, alcançando populações máximas de  $10^9$ UFC.cm<sup>-2</sup> na superfície de cupons, quando cultivada em caldo TYEP e em LDR 12%, tanto a 7 °C como a 22 °C. A formação de biofilme foi confirmada em microscópio eletrônico de varredura, pela observação de aglomerados celulares em multicamadas nos cupons mantidos submersos nos meios de cultura por cinco dias.

Concluiu-se que, dentro da mesma espécie bacteriana, são encontradas estirpes com potencial de formação de biofilmes diferentes. A formação de biofilmes a temperaturas de refrigeração adotadas na indústria de laticínios alerta para o risco que os biofilmes bacterianos formados por *P. fluorescens* e outros deterioradores representam na contaminação do leite.

A maior atividade proteolítica no sobrenadante da cultura mista, em meio LDR 12% contendo cupons com células aderidas, sugere que células aderidas ou em biofilmes podem secretar enzimas para o meio externo. Atividade proteolítica máxima em LDR 12%, a 22 °C, foi de 162,0 Unh<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup>, após 48 h de incubação. Em cultivos apenas com células planctônicas, a atividade proteolítica máxima registrada foi de 77,5 Unh<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup>. A atividade proteolítica de *P. fluorescens* 041 incubada a 22 °C foi sempre maior em LDR 1%, com valores máximos de 118,75 Unh<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup> enquanto em caldo TYEP, o valor máximo de atividade proteolítica foi de 27,5 Unh<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup>. Essa atividade proteolítica não foi alterada em meios com ou sem os cupons contendo células aderidas. Embora tenha apresentado o maior potencial de adesão e formação de biofilme, *P. fluorescens* 097 não apresentou atividade proteolítica elevada.

Pesquisou-se, também, a viabilidade de detecção de população dessas células no leite por métodos imunológicos.

Anti-soros policlonais produzidos em coelhos diferentes contra misturas de estirpes de *P. fluorescens* apresentaram sensibilidades diferentes, com capacidade de detecção de células em concentrações que variam de 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Os anti-soros produzidos não apresentaram reação cruzada com *Burkholderia pseudomallei* 056, *Chryseomonas* 0145, *Providencia stuartii* 051 e *Pseudomonas putida* isoladas do leite cru refrigerado, à exceção dos anti-soros 2A e 3A que interagiram com *Aeromonas*.

Por meio das técnicas de aglutinação em gota e de imunodot-blot, foi possível detectar células de *P. fluorescens* em LDR 12% em concentrações de 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Estes resultados indicam o potencial dessas técnicas para detectar a ocorrência dessa bactéria deterioradora em uma faixa de concentração celular abaixo da comprometedora da qualidade do leite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. M., BARACH, J. 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. 828-834, 1975.
- ADAMS, D.M., BARACH, J.T., SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 5, p. 823-827, 1976.
- AHMAD, I., JINDAL, V. K. An automatic procedure for rapid online estimation of raw milk quality. *Lebensm-wiss u. Technology*, v.39, p. 431-435, 2006.
- ALLEN, J. C., SMITH, C. J. Enzyme-linked immunoassay kits for routine food analysis. **Tibtech**, v 5, p. 193-199, jul. 1987.
- ALLISON, D. G., RUIZ, B., SANJOSE, C., JASPE, A., GILBERT, P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 179-184, 1998.
- ANDRADE, N. J., AJAO, D. B., ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 11, p.1454-1458, 1998a.
- ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998b.
- AUSTIN, J. W., BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 509-519, 1995.

- AZCONA, J. I., MARTÍN, R., HERNÁNDEZ, P. E., SANZ, B. Partial immunological characterization of heat-stable proteases from *Pseudomonas* spp. of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 227-233, 1989.
- BAGGE, D., HJELM, M., JOHANSEN, C., HUBER, I., GRAM, L. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2319-2325, 2001.
- BARACH, J. T., ADAMS, D. M. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 5, p. 823-827, 1977.
- BENDICHO, S., MARTI, G., HERNÁNDEZ, T., MARTÍN, O. Determination of proteolytic activity in different milk systems. **Food Chemistry**, v. 79, p. 245-249, 2002.
- BEYENAL, H., DONOVAN, C., LEWANDOWSKI, Z., HARKIN, G. Three-dimensional biofilm structure quantification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, p. 395-413, 2004.
- BIRKELAND, S.E., STEPANIAK, L., SØRHAUG, T. Quantitative studies of heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* P1 by enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.382-387, 1985.
- BISHOP, J.R., WHITE, C.H. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. **Journal of Food Protection**, v.52, p.805-807, 1989.
- BOLLINGER, N., HASSETT, D. J., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W., McDERMOTT, T. R. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilms-specific gene regulation. **Journal of Bacteriology**, v.183, n. 6, p.1990-1996, 2001.
- BRANDA, S. S., VIK, A., FRIEDMAN, L., KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002. Seção I.
- CANDLISH, A. A. G. Immunological methods in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 8, p. 1-14, 1991.
- CHAE, M. S., SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilm. **Food Microbiology**, v. 18, p.103-112, 2001.
- CHEN, L., DANIEL, R. M. A., COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, n. 13, p.255-75, 2003.

- CHESSA, JEAN-PIERRE, PETRESCU, I., BENTAHIR, M., BEEUMEN, J. V., GERDAY, C. Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolated from a psychrophilic *Pseudomonas* species. **Biochemical et Biophysica Acta**, 1479, p.265-274, 2000.
- CHOPP, D .L., KIRISITS, M. J., MORAN, B., PARSEK, M. R..The dependence of quorum sensing on the depth of a growing biofilm. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 65, p. 1053-1079, 2003.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, R., LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.
- DAVIES, D. G., PARSEK, M.R., PEARSON, J. P., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W., GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.
- DOGAN, B., BOOR, K. J., Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 130-138, 2003.
- DRACZ, S. **Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite**. 1996. 63 p. (Dissertação-Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Review. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1213-1219, 2003.
- DUDDRIDGE, J. E., KENT, C. A., LAWS, J. F. Effect of surface shear stress on the attachment of *Pseudomonas fluorescens* to stainless steel under defined flow conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. v.24, p.153-164, 1982.
- DUYVESTYEN, W. S., SHIMONI, E., LABUZA, T. P. **Milk shelf-life by weibull hazard method**: Determination of the end of shelf life for milk using weibull hazard method. The Coca-Cola Company, Atlanta, GA 30301. Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, p 1-17, 2001
- EWINGS, K. N., O'CONNOR, R. E., MITCHELL, G. E. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in South East Queensland. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 69, p. 65-69, 1984.
- FAIRBAIRN, D. J., LAW, B. A. Proteases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 139-177, 1986.
- FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. Tese de doutorado. Viçosa, 2000.
- GARDEA, A. A., CARVAJAL-MILLÁN, E., HIGUERA-CIAPARA, I., FIGUEROA, C., MOLINA-CORRAL, J., RASCÓN, A., OROZCO A., INDA, A. Calorimetric

assessment of microbial growth in milk as affected by different conditions. **Thermochimica Acta**, v.394, p.179-184, 2002.

GOERES, D. M., LOETTERLE, L. R., HAMILTON, M. A., M.A, RICARDO, KIRBY, D. W., DONLAN, R. M. Statistical assessment of laboratory method for growing biofilms. **Microbiology**, v.151, n 3, p.757-762, 2005.

GONZÁLEZ, I., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E.. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 4, p. 394-401, 1993.

GONZÁLEZ, I., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. E. Detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated meat by sandwich ELISA. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 8, p.710-714, 1994.

GONZÁLEZ, I., MARTIN, R., GARCIA, T., MORALES, P., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. E.. Polyclonal antibodies against protein F from the cell envelope of *Pseudomonas fluorescens* for detection of psychrotrophic bacteria in refrigerated meat using an indirect ELISA. **Meat Science**, v. 42, n.3, p. 305-313, 1996.

GRIFFITHS, M. W. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. **Milchwissenschaft**, v. 44, n. 9, p. -539-543, 1989.

GRIFFITHS, M. W., PHILLIPS, J. D., MUIR, D.D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**, v.50, p. 289-303, 1981.

GUINOT-THOMAS, P., AL AMMOURY, M., LE ROUX, Y., LAURENT, F. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4° C: effect of plasmin and microbial proteases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 685-697, 1995.

HARYANI, S., DATTA, N., ELLIOT, J. A., DEETH, H. C. Production of proteases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1. p. 15-20, 2003.

HOOD, S. K., ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by food borne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37. p.145-153, 1997.

HULL, M. E. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. **Journal Dairy Sci.** v. 30, p.881-884, 1947.

HUMBERT, G., GUINGAMP, M. F. KOUOMEGNE, R., LINDEN, G. Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent. **Journal of Dairy Research**, v. 57, p. 143-148, 1990.

HUNT, S. M.; WERNER, E.M.; HUANG, B.; HAMILTON, M.A., STEWART, P.S. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. **Applied and Environmental Microbiology** v. 70, n.12. p. 7418-7425, 2004.

- IDF- INTERNATIONAL IDF STANDARD. Estimation of numbers of psychrotrophic microorganisms. 132A: 1991.
- JENKINSON, H. F., LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adherer to stay. **Trends in Microbiology**, v.9, n.1, p. 9-10, 2001.
- JEONG, D. G. K., FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 °C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 7, p. 576-586, 1994.
- JOHNSTON, M. D., JONES, M. V. Disinfection tests with intact biofilms: combined use of the Modified Robbins Device with impedance detection. **Journal of Microbiological Methods**. v 21, p. 15-26, 1995.
- JOSEPH, B., OTTA, S. K., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.
- JUFFS, H. S. Proteolysis detection in milk. I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. **Journal of Dairy Research**, v.40, p.371-381, 1973.
- KHARAZMI, A., GIWERCMAN, B., HOIBY, N. Robbin device for biofilm research. **Methods in Enzymology**, v. 310, p.207-215, 1999.
- KOHLMANN, K. L., NIELSEN, S. S., STEENSON, L. R., LADISCH, M.R. Production of protease by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 74. n. 10, p.3275-3283, 1991.
- KORBER, D. R., LAWRENCE, J. R., SUTTON, B., CALDWELL, D. E. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot<sup>+</sup> and Mot<sup>-</sup> *Pseudomonas fluorescens*. **Microbial Ecology**, v.18, p.1-19, 1989.
- LAWRENCE, J. R., KORBER, D.R., HOYLE, B. D., COSTERTON, J. W., CALDWEL, D. E. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 20, p.6558-6567, 1991.
- LE MAGREX E., BRISSET, L., JACQUELIN, L. F., CARQUIN, J., BONNAVEIRO, N., CHOISY, C. Susceptibility to antibacterials and compared metabolism of suspended bacteria versus embedded bacteria in biofilms. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, v. 2, p. 89-95, 1994.
- LIAO, C., McCALLUS, D. E. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 914-921, 1998.
- LYNDSAY, D., BRÖZEL, V. S., MOSTERT, J. F., von HOLY, A. Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. **International Journal of Food Microbiology**. v.54, p.49-62, 2000.

- LÓPEZ-FANDIÑO, R., OLANO, A., SAN JOSÉ, C., RAMOS, M. Application of reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milk. **Journal of Dairy Research**, v. 60, p.111-116, 1993.
- LOUKILI , N. H., ZINK, E., GRANDADAM, S., BIENTZ, M., MEUNIER, O. Effectiveness of detergent-desinfecting agents on *Escherichia coli* 54127 biofilm. **Journal of Hospital Infection**. v.57, p.175-178, 2004.
- MALIK, R. K., PRASAD, R., MATHUR, D. K. Effect of some nutritional and environmental factors on extracellular protease production by *Pseudomonas* sp. B-25. *Lait*, v.65, p.169-183, 1985.
- MARTINS, M. L. **Diversidade de bactérias psicrotróficas proteolíticas de leite e presença do gene que codifica metaloprotease alcalina**. 51p. Tese (M.S.) Universidade Federal de Viçosa. 2003
- MARTINS, M. L., ARAUJO, E. F., MANTOVANI, H. C., MORAES, C. A., VANETTI, M. C. D. Detection of the *apr* gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p. 203-211, 2005.
- MATTA, H., PUNJ, V. An immunoassay for detection of heat-stable proteases from thermotolerant psychrotrophic *Bacillus* spp. of dairy origin. **Microbial Research**, v. 155, p.197-203, 2000.
- MATTA, H., PUNJ, V., KANWAR, S. S. An immuno-dot blot assay for detection of thermostable protease from *Pseudomonas* sp. AFT-36 of dairy origin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 300-302, 1997.
- MAYERHOFER, H. J., MARSHALL, R. T., WHITE, C. H., MARGARET LU. Characterization of heat- stable protease of *Pseudomonas fluorescens*. p. 26. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 44-48, 1973.
- McKELLAR, R. C., CHOLETTE, H. Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen, and phosphate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6. p1224-1227, 1984.
- McKELLAR, R..Determination of the extracellular and cell-associated hydrolase profiles of *Pseudomonas fluorescens* sp.using the Analytab API ZYM system. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p.658-664, 1986.
- MEZENCIO, J. M. S. **Cinética de produção de anticorpos em coelhos e relacionamento antigênico entre estirpes de *Rhizobium japonicum***. 1981. 63 p. (Dissertação-Mestrado em Microbiologia.) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1981.
- MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacteria biofilms in fluid processing operations. Symposium: biofilms: development and control. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2760-2764, 1998.
- MOSTELLER, T. M., BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**. v. 56, n.1, p.34-41, 1993.

- MUIR, D. D. The self-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996a.
- MUIR, D. D. The self-life of dairy products: 2. Raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n.2, p. 44-48, 1996b.
- NICKEL, J. C., RUSESKA, I., WRIGHT, J. B., COSTERTON, J. W. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p.619-624, 1985.
- NICODÈME, M., GRILL, J. P., HUMBERT, G., GAILLARD, J. L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p. 641-648, 2005.
- O'TOOLE, G. A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295–304, 1998b.
- O'TOOLE, G. A., KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998a.
- OKADAK E., TRAFNY, E. Secretion of protease by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.8, p.3281-3288, 2005.
- OUCHTERLONY, O. Hand book of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor. Publishers Inc., Ann. Arbor. Michigan, 215 p., 1968.
- PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas**. 1999. 58 p. (Dissertação-Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- PARSEK, M. R., FUQUA, C. Biofilms 2003 : emerging themes and challenges in studies of surface associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4427-4440, 2004.
- PICARD, C., PLARD, I., RONGDAUX-GAIDA, D., COLLIN, J.-C. Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. **Journal of Dairy Research**, v. 61, p. 395-404, 1994.
- PINTO, C. L. O. **Caracterização da microbiota psicrotrófica proteolítica do leite cru resfriado granelizado**. 2004. (Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- PINTO. U. M. **Quorum sensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite**. 2005. (Tese de Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensm-wiss u. Technology**, v.32, p.321-326, 1999.

- PUNJ, V., MATTA, H. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of thermostable protease from *Pseudomonas* sp.AFT-36 of dairy origin. **Biotechnology Techniques**, v.9, n.4, 1995.
- RAJMOHAN, S., DODD, C. E. R., WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 205-213, 2002.
- RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M. S. and DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.62, n 3, p. 597-635, 1998.
- ROSSONIE, M. M., GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.
- SACHERER, P., DÉFAGO, G., HAAS, D. Extracellular protease and phospholipase C area controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **FEMS Microbiology Letters**, v. 116, p. 155-160, 1994.
- SAUER, K., CAMPER, A. K., ERLICH, G. D., COSTERTON, J. W., DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* display multiple phenotypes during development as a biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.184, n. 4, p. 1140-1154, 2002.
- SHARMA, M., ANAND, S. K. –b– Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, v. 19, p.627-636, 2002b.
- SHARMA, M., ANAND, S. K. –a– Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, v.13, p. 469-477, 2002a.
- SHIRTLIFF, M. E., MADER, J. T., CAMPER, A. K. Molecular interaction in biofilms. **Chemistry and Biology**, v.9, p. 859-871, 2002.
- SIMÕES, M., PEREIRA, M. O., VIEIRA, M. J. Effect of mechanical stress on biofilm challenged by different chemicals. **Water Research**, v.39, p.5142-5152, 2005.
- SORHAUG, T., STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 35-41, 1997.
- SPECK, M.L., ADAMS, D. M. Symposium: impact of Heat stable microbial enzymes in food processing. Heat resistant proteolytic enzymes from bacterial sources. **Journal of Dairy Science**. v. 59, n. 4, p786-789, 1976
- STONE, L. S., ZOTTOLA, E. A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and its attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**. v. 50, p. 957-965, 1985.

- STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D. G., COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.187–209, 2002.
- SUÁREZ, B., FERREIRÓS, C. M., CRIADO, M. T. Adherence of psychrotrophic bacteria to dairy equipment surfaces. **Journal of Dairy Research**, v. 59, p. 381-388, 1992.
- URAZ, G., CITAK, S. The isolation of *Pseudomonas* and other gram (-) psychrotrophic bacteria in raw milks. **Journal Basic of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 129-134, 1998.
- VAN HOUTD, R., MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v.156, p. 626-633. 2005.
- VENEGONI, G., ALTSCHULER, M., .LOPRETO, C. *Aeromonas*. PEEC Bacteriologia. [www.aam.org.ar/novedades/actualization/actualization-em-aeromonas](http://www.aam.org.ar/novedades/actualization/actualization-em-aeromonas). Acesso em: 16 fev. 2006
- VESTERLUND, SATU, ÁLTTA, JOHANNA, KARP, MATTI, OUWEHAND, ARTHUR C. Measurement of bacterial adhesion in vitro evaluation of different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.60, p. 225-233, 2005.
- WHITE, C.H. Rapid methods for estimation and prediction of shelf-life of milk and dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3126-3132, 1993.
- WHITELEY, MARVIN, BROWN, ERIN, McLEAN, ROBERT J. C. An inexpensive chemostat apparatus for the study of microbial biofilms. **Journal of Microbial Methods**, v. 30, p125-132, 1997.
- WIEDMANN, M., WEILMEIER, D., DINEEN, S.S, RALYEA, R., BOOR, J.K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2085-2095, 2000.
- WIRTANEN, G., ALANKO, T., MATILLA-SANDHOLM, T. Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.5, n. 3, p.319–326, 1996.
- WONG, H.C., Y.C. CHUNG, J.A.YU. Formation and removal of attachment of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. **Food Microbiology**, v.19, p.341-350, 2002.
- ZOBELL, CLAUDE E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal Bacteriology**, v.46, p. 39-56, 1943.
- ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in food processing industry - should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p.125-148, 1994.