

CLERIANE ANDRE

**ADESÃO, FORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE BIOFILME POR  
*Staphylococcus aureus* EM POLIESTIRENO NA PRESENÇA DE NISINA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A555a  
2015 Andre, Cleriane, 1988-  
Adesão, formação e composição de biofilmes por  
*Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina /  
Cleriane Andre. – Viçosa, MG, 2015.  
xi, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.35-49.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. *Staphylococcus aureus*. 3.  
Biofilmes. 4. Nisina. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

CLERIANE ANDRE

**ADESÃO, FORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE BIOFILME POR  
*Staphylococcus aureus* EM POLIESTIRENO NA PRESENÇA DE NISINA**

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2015.

---

François Baglinière

---

Míriam Teresinha dos Santos  
(Coorientadora)

---

Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

**Deus e todos que acreditaram em mim**

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, pelo dom da vida e por ter me dado força e esperança em cada momento dessa jornada.

Ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de realização do curso e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

À minha querida orientadora, professora Maria Cristina Dantas Vanetti, agradeço pelo amparo, os ensinamentos, pelos momentos de conselhos, um exemplo de profissional e ser humano.

Aos meus coorientadores, professores Hilário Cuquetto Mantovani e Míriam Teresinha dos Santos.

À professora Dr<sup>a</sup> Adriana Korres do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) que me apresentou o mundo da pesquisa, obrigada pela amizade, conselhos e incentivos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do IFES, Sheila Ribeiro, Paola, Matheus, Walquiriria, Sayonara e Gláucia, pelos momentos sempre leves e com ótima convivência.

À Juliana Juju amiga-irmã, sempre segurou minha onda nos momentos difíceis e compartilhou as alegrias e conquistas acadêmicas. Obrigada por compreender a distância e estar sempre ao meu lado, amizade para vida. Agradeço sua família pelo acolhimento, principalmente a Creuza pelos conselhos e carinho, ao Luran por dividir o tempo dela comigo.

Ao Pedro e família, Bárbara, Renan, meus amigos capixabas que mesmo distantes continuam do meu lado e fazem das minhas visitas a Vitorinha momentos de muita alegria e descontração.

À minha família, meus pais, Zenadir e Cleres (*in memoriam*) obrigada pelo amor, pelos ensinamentos. Aos meus irmãos Clebes e Bia e cunhados Silvana e Marcone pela amizade e apoio.

Aos meus sobrinhos, querido Ryan e Maria Antônia pelas alegrias e amor incondicional.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos e contribuição para a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente Nilcéa pelo carinho e lembretes, Letícia, Sandra e José Carlos.

Ao Natan Pimentel Filho, obrigada pela amizade, atenção, disponibilidade, carinho e pelos ensinamentos.

Às minhas amigas de repúblicas, Gabriela, Larissa e Amélia obrigada pelos momentos de alegrias, comilanças e desabafos.

Ao Breno, meu amigo alma gêmea, Laiane a mais doce, Marina a descolada, Gabi a gaúcha simpática, sem vocês minha vida em Viçosa não teria tanta graça.

Aos colegas de turma e aos “Barra pesada”, a amizade, aos momentos compartilhados de estudos e também das festinhas sempre divertidas.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Natan, Solimar, Felipe, Amanda, Andrés, Érica, François, obrigada pela amizade, ajuda, convivência e companheirismo.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Bresciani pelo apoio e incentivo de sempre.

À Karla do Núcleo de Microscopia.

Ao Paulo pela ajuda com a estatística.

À banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões.

A todos que, direta ou indiretamente, perto ou longe, torceram, acreditaram e me ajudaram fazer que esse sonho fosse possível.

**MUITO OBRIGADA.**

## **BIOGRAFIA**

CLERIANE ANDRE, filha de Cleres Andre e Zenadir Maria de Oliveira Andre, nasceu em Colatina, Espírito Santo no dia 11 de outubro de 1988.

Em fevereiro de 2013, graduou-se em Bacharel em Nutrição pela Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo.

Em março de 2013, ingressou no Programa de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Formação de biofilmes por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
2.3 Controle de biofilme .....	5
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	10
3.2 Pesquisa de genes envolvidos na adesão e na formação de biofilmes por <i>Staphylococcus</i> spp. pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	11
3.3 Bacteriocina e sanitizantes .....	12
3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de nisina e dos sanitizantes .....	12
3.5 Condicionamento de cupons de poliestireno.....	13
3.5.1 Preparo e limpeza dos cupons .....	13
3.5.2 Condicionamento das superfícies.....	13
3.6 Avaliação da hidrofobicidade da superfície dos cupons .....	13
3.6.1 Medida do ângulo de contato .....	13
3.7 Avaliação da adesão de <i>S. aureus</i> em superfície de poliestireno condicionada com nisina.....	13
3.8 Avaliação do crescimento de <i>S. aureus</i> na presença de antimicrobianos .....	14
3.9 Avaliação da formação de biofilme por <i>Staphylococcus</i> spp. na presença de antimicrobianos.....	15
3.10 Caracterização da composição do biofilme de <i>S. aureus</i> na presença e ausência de nisina.....	15
3.11 Avaliação da estrutura dos biofilmes de <i>Staphylococcus</i> por microscopia confocal de varredura a laser na presença e ausência de nisina .....	16
3.12 Análises dos dados .....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Presença de genes envolvidos na adesão e formação de biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp.....	17
4.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de nisina e dos sanitizantes sobre <i>Staphylococcus</i> .....	18
4.3 Efeito do condicionamento de cupons de poliestireno com antimicrobianos sobre a hidrofobicidade da superfície.....	20

4.4	Efeito do condicionamento da superfície de poliestireno com antimicrobianos sobre a adesão de <i>S. aureus</i> .....	22
4.5	Efeito dos antimicrobianos sobre o crescimento e a formação de biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp. em poliestireno .....	23
4.6	Composição do biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp. ....	27
4.7	Estrutura dos biofilmes de <i>Staphylococcus</i> spp. avaliados por microscopia confocal de varredura a laser .....	30
5	CONCLUSÃO.....	34
	REFERENCIAS.....	35

## RESUMO

ANDRE, Cleriane, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Míriam Teresinha dos Santos.

*Staphylococcus aureus* é um patógeno humano oportunista que apresenta riscos a saúde humana, é capaz de aderir em superfícies bióticas e abióticas e formar biofilmes, tornando as células mais protegidas e de difícil remoção. Células liberadas do biofilme podem se constituir em importante fonte de contaminação de alimentos, comprometendo a qualidade e a segurança dos mesmos. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da bacteriocina nisina e dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético, em concentrações subinibitórias, sobre a hidrofobicidade da superfície de poliestireno, sobre o crescimento e formação de biofilmes por estirpes de *S. aureus* e ainda, verificar a interferência da nisina sobre a composição e estrutura do biofilme desse patógeno. Células de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foram usadas como referência para formação de biofilmes. O cultivo das bactérias foi feito em caldo Luria-Bertani (LB) ou em meio sintético (MS). A presença de genes de adesão foi determinada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e os três genes avaliados, *icaA*, *icaD* e *clfB*, foram encontrados nas estirpes COL e FRI 722 de *S. aureus*, enquanto a estirpe Embrapa 4018 de *S. aureus* e em *S. epidermidis*, apenas o gene *icaA* foi identificado. A hidrofobicidade da superfície de poliestireno foi avaliada por meio da medida do ângulo de contato e constatou-se que o meio LB reduziu a hidrofobicidade da superfície, dificultando a observação do efeito dos antimicrobianos sobre a mesma. O tratamento da superfície de poliestireno com MS adicionado de 1,34 mg/L de nisina reduziu a adesão de *S. aureus*. Concentrações subinibitórias de 2,01 mg/L; 1.500 mg/L e 0,40 mg/L respectivamente dos antimicrobianos nisina, hipoclorito de sódio e do ácido peracético foram adicionadas isoladamente ou combinadas entre si ao caldo LB e constatou-se a diminuição da formação de biofilmes pela cultura mista de estirpes de *S. aureus* e por *S. epidermidis* em microplacas de poliestireno quando os antimicrobianos agiram isoladamente. A composição de polissacarídeos e DNA nos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi alterada quando o cultivo ocorreu na presença de 2,01 mg/L de nisina. Entretanto, o conteúdo em proteínas nos biofilmes formados pela cultura

mista das estirpes de *S. aureus* estudadas ou por *S. epidermidis* não foi alterado pela presença de nisina no meio de cultura em concentração subinibitória. A estrutura do biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi avaliada por microscopia confocal a laser, confirmando os resultados quantitativos de que a presença de concentração subinibitória de nisina reduz a formação de biofilmes por estas espécies. Estes resultados demonstram que a investigação de produtos alternativos para auxiliar no controle e combate aos biofilmes é estratégia promissora além de contribuir com informações sobre a composição do biofilme de *S. aureus*.

## ABSTRACT

ANDRE, Cleriane, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Adhesion, formation and composition of biofilm by *Staphylococcus aureus* on polystyrene in the presence of nisin.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Míriam Teresinha dos Santos.

*Staphylococcus aureus* is an opportunistic human pathogen that represents risks to the human health and is able to adhere and form biofilms on biotic and abiotic surfaces, being cells more protected and difficult to remove. Cells released from biofilms can be an important source of food contamination, compromising quality and safety. The aim of this work was to investigate the effect of the bacteriocin nisin and the sanitizers sodium hypochlorite and peracetic acid, in subinhibitory concentration, on the polystyrene surface hydrophobicity, on the growth and biofilm formation by *S. aureus* strains and also, verify the interference of nisin on the composition and structure of the pathogen biofilm. As a control of biofilm formation, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 was used. Bacteria were cultivated in Luria-Bertani (LB) broth or in synthetic medium (SM). The presence of adhesion genes was determined by polymerase chain reaction (PCR) and the three evaluated genes, *icaA*, *icaD*, and *clfB*, were found in *S. aureus* COL and FRI 722, while in the strain Embrapa 4018 and in *S. epidermidis*, only *icaA* gene was identified. The hydrophobicity of the polystyrene surface was evaluated by the contact angle measurement and it was found that the LB broth reduced the surface hydrophobicity by itself, hindering the observation of the antimicrobials effect on it. Treatment of the polystyrene surface with SM supplemented with 1.34 mg/L of nisin reduced *S. aureus* adhesion. Subinhibitory concentrations of 2.01 mg/L; 1,500 mg/L and 0.40 mg/L of the antimicrobials nisin, sodium hypochlorite, and peracetic acid, respectively, were added separately or combined with each other in LB broth and the reduction of biofilm formed by *S. aureus* strains and *S. epidermidis* in polystyrene microtiter plates occurred when the antimicrobials acted alone. The content of polysaccharides and DNA in the biofilms of *S. aureus* and *S. epidermidis* was altered when cultivated in the presence of 2.01 mg/L of nisin. However, the protein percentage in the biofilm formed by the culture mix composed by the three studied strains of *S. aureus* or by *S. epidermidis* was not modified by the presence culture medium supplemented with subinhibitory concentration of nisin. Biofilm formation by *S. aureus* and *S. epidermidis* was also evaluated by confocal laser microscopy, confirming the quantitative results in which

subinhibitory concentrations of nisin reduces biofilm by these species. These results demonstrate that the investigation of alternative products to help control and eradicate biofilms is a potential strategy and also provides information on the composition of *S. aureus* biofilms.

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um patógeno humano oportunista de grande importância em diferentes setores, como por exemplo, médico e na indústria de alimentos, em função da sua capacidade de produzir toxinas. Além do frequente envolvimento em casos e surtos de intoxicação alimentar, *S. aureus* é capaz de aderir e formar biofilmes em diferentes superfícies bióticas e abióticas e causar sérios problemas de contaminação aos alimentos e danos aos equipamentos. Os biofilmes são agregados de células que apresentam tendência de aderir às superfícies úmidas, multiplicar e embeber-se em uma matriz viscosa composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas por elas próprias.

Células liberadas dos biofilmes podem ser importante fonte de contaminação e assim, causarem danos à qualidade e à segurança dos alimentos, uma vez que os patógenos também podem estar presentes em biofilmes. Na forma de células sésseis, as bactérias resistem melhor às condições desfavoráveis do ambiente, incluindo estresses causados por estímulos externos como a ação de antimicrobianos. A formação de biofilmes deve ser prevenida, pois uma vez formados, são de difícil remoção. Assim, busca-se a aplicação de tratamentos anteriores ou associados à sanitização que reduzam ou impeçam a adesão e, ou promovam a desestabilização da matriz extracelular, permitindo assim que os protocolos atuais de limpeza sejam melhorados, aumentando a eficácia dos sanitizantes que são incapazes de penetrar na matriz extracelular de biofilmes. A pesquisa de antimicrobianos que impeçam ou reduzam a formação de biofilmes bacterianos é de importância estratégica. Bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, tem potencial para redução de biofilmes. Nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, tem o uso autorizado em alimentos em diversos países e é eficaz contra muitas bactérias, especialmente as gram-positivas. Além de usada como aditivo alimentar para controlar o crescimento de micro-organismos indesejáveis, nos últimos anos pesquisas exploram o efeito de nisina e de outras bacteriocinas sobre os biofilmes.

Considerando a necessidade de avaliar procedimentos que controlem a formação de biofilmes, este trabalho avaliou os efeitos de nisina e outros antimicrobianos, sobre a adesão e formação de biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* e ainda, verificou a interferência da nisina sobre a composição e a estrutura dos biofilmes dessas espécies.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é um patógeno humano oportunista que representa riscos na área médica e no setor alimentar. Na indústria de alimentos, além do frequente envolvimento em casos e surtos de intoxicação alimentar, *S. aureus* é capaz de aderir e formar biofilmes em diferentes superfícies e causar sérios problemas de contaminação aos alimentos (SHALE *et al.*, 2005; RODE *et al.*, 2007 DI CICCIO *et al.*, 2015).

A patogenicidade de *S. aureus* resulta da combinação de virulência mediada por toxinas, invasividade e resistência a antibióticos (LE LOIR *et al.*, 2003; RODE *et al.*, 2007). O envolvimento deste micro-organismo em surtos de intoxicação alimentar deve-se à capacidade da maioria das estirpes de produzir enterotoxinas, responsáveis por uma das formas predominantes de gastroenterites (STAMFORD *et al.*, 2006; ARQUÉS *et al.*, 2008). A contaminação por *S. aureus* ou de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos tem sido relatada em diversos estudos (ALMEIDA FILHO e NADER FILHO, 2000; CARVALHO *et al.*, 2007).

*S. aureus* é considerado um micro-organismo pouco competidor e apresenta maior risco em alimentos onde a microbiota contaminante foi inativada ou inibida. Apesar de ser pouco competidor, é um micro-organismo versátil, capaz de se adaptar a diferentes nichos ecológicos (TOMASINI *et al.*, 2014). Os biofilmes formados em diferentes superfícies, além de serem considerados importante fator de virulência de *S. aureus* (TRACHOO, 2003; SHALE *et al.*, 2005), são também forma de persistência do patógeno no ambiente e fonte de contaminação de alimentos (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de micro-organismos que apresenta tendência de aderir a superfícies úmidas, multiplicar e embeber-se em uma matriz viscosa composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas por eles próprios (CARPENTIER e CERF, 1993; SIMÕES *et al.*, 2010).

Na forma de células sésseis, aderidas em biofilmes, as bactérias resistem melhor às condições desfavoráveis do ambiente, incluindo estresses causados por estímulos externos (HERRERA *et al.*, 2007) como dessecação, radiação ultra-violeta, tratamentos com agentes antimicrobianos e sanitizantes em razão da dificuldade de difusão dos

antimicrobianos, da atividade metabólica das células do biofilme e, ou à variabilidade fenotípica dentre as células no próprio biofilme (PARSEK e FUQUA, 2004).

Os processos que regem a formação de biofilme incluem: (i) pré-condicionamento da superfície por macromoléculas presentes no líquido ou que, intencionalmente, revestem a superfície; (ii) transporte de células planctônicas do líquido para a superfície; (iii) forças atrativas e repulsivas entre a superfície e os micro-organismos, forças estas envolvidas com a adesão de bactérias à superfícies, incluindo as forças de van der Waals e forças eletrostáticas, além de ligações iônicas e forças hidrofóbicas. A produção de EPS aumenta ainda mais a adesão de micro-organismos às superfícies; (iv) adesão irreversível, que ocorre quando as forças atrativas são maiores do que as forças de repulsão; (v) produção de moléculas de sinalização célula-célula e transporte de substratos para e dentro do biofilme; (vi) metabolismo do substrato pelas células ligadas ao biofilme e transporte de produtos para fora do biofilme. Esses processos são acompanhados pelo crescimento celular, replicação e produção de EPS; (vii) liberação dos micro-organismos do biofilme, pela desagregação do mesmo (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BRYERS e RATNER, 2004).

Os biofilmes de *Staphylococcus* spp. tem como componentes principais, polissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e proteínas (RICE *et al.*, 2007; OTTO, 2008; IZANO *et al.*, 2008). Tanto *S. aureus* quanto *Staphylococcus epidermidis* produzem poli- $\beta$ (1,6)-N-acetil-d-glucosamina, um polissacarídeo de superfície que é referido como adesina intracelular polissacarídica (PIA) (MACK *et al.*, 1996; CRAMTON *et al.*, 1999). Este polissacarídeo contribui para o acúmulo de células no biofilme e evasão da resposta imune de patógenos (VUONG *et al.*, 2004; KROPEC *et al.*, 2005). Nos biofilmes de *S. aureus*, as interações entre a superfície das células e superfícies hidrofílicas abióticas são mediadas por PIA (GOTZ, 2002). Este polissacarídeo é codificado pelo operon *ica* (*icaADBC*) (CRAMTON *et al.*, 1999), cujos produtos também estão envolvidos na síntese de uma matriz polissacarídica. Os genes *icaA* e *icaD* são de fundamental importância na formação de biofilmes em *S. aureus* e *S. epidermidis* (HEILMANN *et al.*, 1996; CRAMTON *et al.*, 1999; YAZDANI *et al.*, 2006).

A presença de DNA extracelular e de pequenas moléculas intracelulares liberadas está associada à estrutura e à estabilidade dos biofilmes de vários micro-organismos (WHITCHURCH *et al.*, 2002; ALLESEN-HOLM *et al.*, 2006; SPOERING

e GILMORE, 2006; RICE *et al.*, 2007; THOMAS *et al.*, 2009; KIRKPATRICK e VIOLLIER, 2010) incluindo biofilmes maduros de *S. aureus* (BAYLES, 2007; RICE *et al.*, 2007; IZANO *et al.*, 2008). A fixação das células às superfícies também é facilitada por eDNA (RICE *et al.*, 2007; HEIJSTRA *et al.*, 2009).

Além dos exopolissacarídeos e eDNA, as proteínas também são conhecidas por comporem os biofilmes e, entre as de maior relevância, estão as adesinas (HUSSAIN *et al.*, 1997; CUCARELLA *et al.*, 2001), diferentes proteínas incluindo as da família de componentes de superfície microbianos, que reconhecem moléculas adesivas da matriz que estão envolvidas na adesão de *S. aureus* e podem mediar a aderência de diferentes tipos de células às superfícies (HEILMANN *et al.*, 1996; FOSTER e HOOK, 1998). Grupos de proteínas de superfície denominadas Bap (proteínas associadas a biofilmes) foram identificados em *S. aureus* e parecem promover a adesão às superfícies bióticas e abióticas. Uma dessas proteínas foi caracterizada por Cucarella *et al.* (2001) e sua função foi confirmada no processo de adesão em experimentos utilizando como base, um padrão de rastreio de transposons em mutantes incapazes de aderirem à superfície de poliestireno. Além de Bap, outras proteínas de superfícies como SasG, FnBPs e Spa também foram identificadas em *S. aureus* e a formação de biofilmes mediada por proteínas *in vivo* é considerada importante fator de virulência (MERINO *et al.*, 2009; MARTI *et al.*, 2010).

Em resposta ao aumento da densidade populacional, *S. aureus* é capaz de reconhecer uma molécula sinal (AIP) envolvida no mecanismo de *quorum sensing*. Essa molécula foi primeiramente descrita como um regulador pleiotrópico de exotoxinas estafilocócicas, proteases e proteínas de superfície (LINDSAY e FOSTER, 1999; VUONG *et al.*, 2000). Com o aumento do número de células, o sistema de sinalização *agr* ativa a transcrição de genes envolvidos na produção de toxinas e, ao mesmo tempo, diminui a expressão de genes de proteínas de superfície, inibindo a formação de biofilmes ou liberando as células já aderidas (IWATSUKI *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que estirpes de *S. aureus* deficientes do sistema *agr* formaram biofilmes mais robustos comparados às estirpes selvagens (MARTI *et al.*, 2010).

O sistema *agr* controla a produção de enzimas que degradam a matriz do biofilme. O proteoma extracelular de *agr* inclui proteases múltiplas e pequenas toxinas formadoras de poros chamadas modulinas solúveis em fenol (PSMs). Embora o fenótipo das estirpes mutantes *agr* em biofilmes possa variar dependendo da variação genética e

das condições de ensaio, a ativação do sistema *agr* está geralmente associada à inibição da maturação do biofilme (BOLES e HORSWILL, 2011). *S. aureus* não forma biofilmes sob condições de elevada atividade de *agr* e a reativação de *agr* resulta na desestruturação do biofilme maduro (BOLES e HORSWILL, 2008). Além disso, o sistema *agr* é mais ativo em células de *S. aureus* e *S. epidermidis* que foram liberadas do biofilme, fornecendo mais evidências de que a indução de *agr* resulta na desmontagem do biofilme (YARWOOD *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2011).

Micro-organismos liberados do biofilme podem ser importante fonte de contaminação e causar danos à qualidade e na segurança dos alimentos, uma vez que patógenos também podem estar presentes em biofilmes (MARQUES *et al.*, 2007). A formação de biofilme em superfícies de contato com alimentos pode ser controlada por meio da limpeza, utilizando métodos químicos e físicos, porém as bactérias que vivem em biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos e difíceis de serem removidas mecanicamente (SIMÕES *et al.*, 2010).

### **2.3 Controle de biofilme**

A aplicação regular de procedimentos de limpeza e desinfecção é uma estratégia comum utilizada para controlar a instalação de micro-organismos patogênicos e deterioradores em equipamentos industriais ou nos próprios produtos (JAHID e HA, 2012). No entanto, tais procedimentos podem não ser totalmente eficazes sobre estruturas de biofilmes e, assim, induzir a seleção de fenótipos resistentes (SIMÕES *et al.*, 2010)

Diferentes produtos químicos podem ser utilizados na limpeza de utensílios e equipamentos nas indústrias alimentícias, incluindo produtos tensoativos ou alcalinos, usados para suspender e dissolver os restos de alimentos pela diminuição da tensão superficial, ou emulsão de gorduras e desnaturação de proteínas (MAUKONEN *et al.*, 2003). A eficácia dos sanitizantes pode ser limitada pela presença de material orgânico, incluindo gorduras, carboidratos e proteínas. Além disso, pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, concentração e tempo de contato também são fatores importantes que influenciam a ação dos sanitizantes. Cloro, peróxido de hidrogênio, iodo, ozônio e ácido peracético estão entre os principais agentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos (BREMER *et al.*, 2002; KUDA *et al.*, 2008).

O hipoclorito de sódio (NaClO) é um composto químico usado para branqueamento ou desinfecção e, como tal, tem sido utilizado para a desinfecção de superfícies na indústria de alimentos (SREY *et al.*, 2013). É um poderoso agente oxidante que interfere com a síntese de DNA e reage com as proteínas intracelulares, parede celular e componentes da matriz extracelular (RUSSEL, 2003), entretanto, tem uma difusão limitada nos biofilmes (DEBEER *et al.*, 1994).

O ácido peracético é considerado um antimicrobiano eficaz por possuir um potencial oxidativo elevado. Apesar de não possuir uma ação específica, este composto é bastante reativo com enzimas intracelulares, proteínas, DNA, membrana celular e componentes da matriz extracelular. O tamanho pequeno da molécula facilita sua difusão através da matriz do biofilme (KITIS, 2004; SAA-IBUSQUIZA *et al.*, 2011). Uma vantagem desse biocida é que ele possui baixo risco ambiental, pois não produz compostos tóxicos ao reagir com materiais orgânicos (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

Para retirar organismos do biofilme, a solução de higienização deve ser capaz de penetrar na matriz de EPS e ganhar acesso às células microbianas promovendo a inativação e a remoção do mesmo (SOUZA *et al.*, 2014). Estudos vêm sendo realizados com o objetivo de se entender os efeitos dos métodos químicos na remoção do biofilme, mas ainda é um desafio a remoção dos biofilmes por meio de sanitizantes. Marques *et al.* (2007) compararam a eficiência de três biocidas, dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogénio e ácido peracético, sobre a inativação de biofilmes de *S. aureus* aderidos a superfícies de aço inoxidável e vidro. Eles verificaram que o ácido peracético foi o mais eficiente na remoção do biofilme formado por *S. aureus* em ambas as superfícies, entretanto não foi capaz de remover completamente o biofilme.

Toté *et al.* (2010) avaliaram o efeito inibitório de diferentes biocidas sobre a viabilidade celular e os biofilmes de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e, dentre os biocidas analisados, o hipoclorito de sódio mostrou-se efetivo, tanto na redução da viabilidade das células aderidas quanto na remoção da matriz do biofilme. Meira *et al.* (2012) verificaram o efeito de ácido peracético e hipoclorito de sódio sobre a redução do número de células viáveis de *S. aureus* em biofilmes pré-formados em superfícies de poliestireno e aço inoxidável e os resultados mostraram que o ácido peracético foi mais eficaz na redução de células viáveis presentes na estrutura do biofilme. Nas condições avaliadas, ambos os desinfetantes diminuíram as contagens de células aderidas às

superfícies entretanto, não foram eficientes para a completa remoção das células de *S. aureus* do biofilme. Resultado semelhante foi encontrado por Souza *et al.* (2014), onde esses sanitizantes não foram capazes de remover biofilmes de *S. aureus* pré-formados em superfície de polipropileno e aço inoxidável.

As células vivas e residuais aderidas às superfícies após a aplicação de sanitizantes reforçam o biofilme como uma fonte provável de contaminação cruzada, principalmente em superfícies de processamento de alimentos (MEIRA *et al.*, 2012). Os materiais comumente utilizados no setor alimentício, tais como o aço inoxidável, vidro, borracha, policarbonato, poliuretano, poliestireno, polipropileno, titânio, alumínio e cerâmica vem sendo investigados quando a capacidade de adesão microbiana. A possibilidade de condicionamento dessas superfícies com substâncias antimicrobianas surgem como alternativas no controle da colonização por micro-organismos deterioradores e patogênicos, uma vez que se entende que a prevenção da adesão é um fator muito importante (DONLAN, 2001, SIMÕES *et al.*, 2010, VÁZQUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2013, HAMADI *et al.*, 2014, PIMENTEL-FILHO *et al.*, 2014, DI CICCIO *et al.*, 2015).

Apesar da aplicação de tecnologias modernas e conceitos de segurança na indústria de alimentos, ainda há muitos problemas relacionados à contaminação de alimentos por patógenos alimentares (DI CICCIO *et al.*, 2015). Alternativas para aumentar a conservação e segurança de alimentos envolvem o uso empírico de micro-organismos e, ou seus produtos para a conservação de alimentos e, segundo Ross *et al.* (2002), esta tem sido uma prática comum na história da humanidade. O ácido láctico e outros subprodutos do metabolismo das bactérias lácticas, incluindo peróxido de hidrogênio, diacetil, acetoína, reuterina, reuteriicina, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas agem como bioconservantes pela alteração das propriedades intrínsecas dos alimentos e inibem micro-organismos deterioradores (MAGNUSSON e SCHNÜRER, 2001; DEEGAN *et al.*, 2006) Peptídeos sintetizados ribossomicamente e com propriedades antimicrobianas, são produzidos por muitos organismos vivos desde procariotos até eucariotos superiores (PAPAGIANNI, 2003) e despertam o interesse como inibidores de micro-organismos importantes em alimentos.

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas com atividade antimicrobiana produzidas por diferentes grupos de bactérias. A nisina, um peptídeo antimicrobiano natural, foi isolado de *Lactococcus lactis* e é o lantibiótico mais conhecido e

amplamente estudado. A nisina vem sendo empregada na conservação de alimentos, reconhecida pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 1989 como substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para utilização em alimentos. No Brasil, em 1996, foi autorizado o uso da nisina em queijos pasteurizados para prevenir o crescimento indesejável de bactérias gram-positivas esporogênicas deterioradoras, cujos esporos resistem à pasteurização (BRASIL, 1996).

A atividade antibacteriana de nisina é atribuída à sua interação com os lipídeos aniônicos na membrana citoplasmática de células bacterianas, resultando numa perturbação da membrana, formando poros, resultando em efluxo de íons, dissipação da força-protomotiva, hidrólise de ATP e, conseqüentemente, perda da viabilidade e lise celular (BREUKINK *et al.*, 2003; ENNAHAR *et al.*, 2000; TONGA *et al.*, 2014). Sabe-se que a nisina é eficaz contra muitas bactérias gram-positivas, entre elas *S. aureus* e pode agir sobre gram-negativas, como *Salmonella*, quando associada a outros compostos (PRUDÊNCIO *et al.*, 2014). Leriche *et al.*, (1999) examinaram a sobrevivência de células do biofilme e células planctônicas de *L. monocytogenes* na presença de uma estirpe produtora de nisina e constataram redução de, pelo menos dois ciclos logarítmicos, nas contagens do patógeno. Nel *et al.* (2002) compararam o efeito de bacteriocinas contra células planctônicas e em biofilmes de *Oenococcus oeni* e verificaram que pediocina foi muito mais eficaz contra biofilmes, enquanto que as células planctônicas foram mais sensíveis à nisina.

Além de inibir o crescimento de micro-organismos específicos, apesar de ainda haver poucos estudos, o potencial das bacteriocinas para o controle da formação de biofilmes bacterianos vem sendo explorado. Nisina, na concentração de 250 UI/mL foi suficiente para reduzir em 99 % o número de células de *S. aureus* planctônicas e em biofilmes em superfícies de polipropileno (CABO *et al.*, 2009). Em superfície de aço inoxidável, a reuterina, bacteriocina produzida por algumas estirpes de *Lactobacillus reuteri*, apresentou efeito bactericida sobre biofilmes de *E. coli* e *L. innocua* após 30 segundos de exposição (EL-ZIENY e JAKOBSEN, 2009). Nesse último estudo, o efeito sinérgico sobre ambos os micro-organismos foi observado quando reuterina foi combinada com hipoclorito de sódio ou nisina. Sadowska *et al.* (2010) verificaram que metabólitos de lactobacilos semelhantes a bacteriocinas foram capazes de suprimir a formação de biofilmes de estirpes de *Staphylococcus* e induzir mudanças ultra-estruturais em *S. aureus* e *S. epidermidis*, que levaram à inativação celular. Davison *et*

*al.* (2010) verificaram a ação antimicrobiana de cloro, glutaraldeído e nisina no interior dos grupos celulares em biofilmes de *S. epidermidis* e relataram que nisina alcançou o interior do biofilme mais rápido que os demais agentes antimicrobianos resultando em rápida e uniforme perda de fluorescência das células, sem contudo, qualquer remoção do biofilme. Nostro *et al.* (2010) incorporaram diferentes concentrações de nisina em filmes de etileno acetato de vinila (EVA) para avaliar o efeito na capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Os resultados revelaram que a nisina presente nos filmes de EVA foi eficaz na redução da formação de biofilmes na superfície apresentando-se mais efetiva contra *S. epidermidis* do que contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Quando usada na concentração 25 µg/mL, esta bacteriocina impediu a formação de biofilme por 25 estirpes de *S. aureus* (SUDAGIDAN e YEMENICIOGLU, 2012). A inativação de células sésseis de *S. aureus* aumentou notavelmente quando a bacteriocina enterocina AS-48 foi usada na concentração 50 mg/L combinada com cloreto de benzalcônio, triclosan ou cloridrato de polihexametileno biguanida em microplacas de poliestireno (CABALLERO *et al.*, 2013). Pimentel-Filho *et al.* (2014) avaliaram concentrações subinibitórias de 0,40 µM das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina no condicionamento de cupons de poliestireno e verificaram que essas bacteriocinas podem reduzir a adesão de *S. aureus*, provavelmente em razão de alterações na hidrofobicidade das superfícies das células bacterianas e do poliestireno.

Considerando a importância da adesão de *S. aureus* seguida da formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos e o risco potencial de contaminação cruzada, faz-se necessário compreender melhor os efeitos de antimicrobianos, particularmente a bacteriocina nisina no condicionamento de superfícies utilizadas pela indústria alimentícia e sua interferência no processo de adesão celular e em biofilmes quando combinada a outros antimicrobianos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Genética de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia, pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. Também foram utilizadas as instalações do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

#### 3.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Os micro-organismos teste utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** Relação das bactérias usadas neste estudo

Bactérias	Fonte de isolamento
<i>Staphylococcus aureus</i> COL	Humanos, MRSA*
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 722	Alimentos
<i>Staphylococcus aureus</i> EMBRAPA 4018	Mastite bovina
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	Cateter sepsis

\**S. aureus* resistente à meticilina.

Os estoques das bactérias usadas foram feitos a partir de culturas em caldo Luria-Bertani (LB) contendo 1 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura e 0,4 % de cloreto de sódio a 37 °C por 18 h e estriadas em ágar para contagem padrão (PCA) (Oxoid, Inglaterra) e ágar Baird-Parker (Himedia, Índia). Colônias isoladas foram submetidas à confirmação da identidade pela coloração de Gram e pelo kit Staphclin (Laborclin, Brasil). As culturas foram mantidas a - 20 °C em caldo LB acrescido de 20 % de glicerol. Para a realização dos experimentos, as culturas de *Staphylococcus* spp. foram previamente cultivadas em caldo LB a 37 °C por 18 h em aerobiose sob agitação a 150 rpm. A partir destes cultivos, inóculos foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo caldo LB, ajustando-se a densidade óptica inicial a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) para 0,1. Os frascos foram incubados a 37 °C a 150 rpm e o crescimento foi monitorado em espectrofotômetro modelo 1510 (Thermo Fisher Scientific, Finlândia) até as culturas atingirem a  $DO_{600nm}$  de 0,2. A estirpe *S. epidermidis* ATCC 35984, previamente

caracterizada como forte formadora de biofilme, foi utilizada nos ensaios como controle positivo da formação de biofilme.

### **3.2 Pesquisa de genes envolvidos na adesão e na formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A presença de genes *icaA*, *icaD* e *clfB*, envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis*, foi avaliada após o cultivo das células em caldo LB a 37 °C, sob agitação a 150 rpm, até alcançar DO<sub>600nm</sub> de 0,2. O DNA total das células foi extraído utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purifications (Promega, EUA), conforme descrito pelo fabricante. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação estão apresentadas na Tabela 2. A amplificação foi realizada em termociclador modelo A200 (Veragle, China), em reação com volume de 25 µL contendo 1 µL de DNA, 1 µL dos respectivos oligonucleotídeos, 0,2 µL de DNA polimerase (GoTaq<sup>®</sup>, Promega, EUA), 1 µL de dNTPs, 5 µL de tampão de reação 5X Green GoTaq<sup>®</sup> (Promega, EUA) e 15,8 µL de água destilada estéril.

A reação foi realizada nos seguintes passos: incubação a 94 °C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 30 s (desnaturação), 55 °C por 1 min (anelamento), 72 °C por 30 s (extensão) e 72 °C por 1 min para finalização. Após a amplificação, 12 µL da amostra foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TBE (45 mM Tris-borato e 1 mM EDTA) corado com brometo de etídeo. Foi utilizado um marcador de tamanho 1.000 pb para averiguar o tamanho dos genes amplificados. As imagens dos fragmentos de DNA foram feitas em transiluminador modelo L-PIX CHEMI (Loccus Biotecnologia, Alemanha) sob emissão de luz ultravioleta.

**Tabela 2** Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes envolvidos na formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp.

Gene	Sequência (5'-3')	Referência
<i>IcaA</i>	1-GAGGTAAAGCCAACGCACTC	Korem <i>et al.</i> , 2010
	2-CCTGTAACCGCACCAAGTTT	
<i>IcaD</i>	1-GGGTGGATCCTTAGTGTTACAATTTT	Korem <i>et al.</i> , 2010
	2-TGACTTTTTTGGTAATTCAAGGTTGTC	
<i>ClfB</i>	1-AATGCCATCATTGCACCAAA	Korem <i>et al.</i> , 2010
	2-CACAAAACCTGATGCTTTACCAGAAA	

### 3.3 Bacteriocina e sanitizantes

Solução estoque da bacteriocina nisina (2,5 % nisina,  $\geq 1.000$  UI/mg, Sigma-Aldrich, Alemanha) a 1.000 mM foi preparada em tampão fosfato de sódio (PBS) (10 mM, pH 7,2) e armazenada a 7 °C até a utilização. Foram utilizados os sanitizantes ácido peracético (0,2 %, p/p, Voxilon, Brasil) e hipoclorito de sódio (10 % cloro ativo, Marca comercial, Brasil), comumente empregados na indústria de alimentos para desinfecção de superfícies.

### 3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de nisina e dos sanitizantes

Para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos, 200  $\mu$ L de caldo LB suplementados com diferentes concentrações de nisina (de 0,67 a 11,39 mg/L), hipoclorito de sódio (de 50 a 4.000 mg/L) e ácido peracético (de 0,20 a 2,50 mg/L) foram transferidos para microplacas de poliestireno contendo 96 poços e inoculados com, aproximadamente,  $5 \times 10^5$  UFC/mL das diferentes culturas de *Staphylococcus* spp. previamente propagadas no mesmo meio LB sem a presença dos antimicrobianos. A concentração mínima capaz de impedir a turvação do meio após 18 h de incubação a 37 °C foi considerada como o valor MIC dos referidos antimicrobianos.

### **3.5 Condicionamento de cupons de poliestireno**

#### **3.5.1 Preparo e limpeza dos cupons**

Cupons de poliestireno medindo 1,0 x 1,0 x 0,1 cm foram previamente higienizados com água e detergente líquido neutro. Após serem enxaguados em água destilada, os cupons foram transferidos para béquers contendo álcool 70 % e deixados em banho ultrassom 100 W MSE 20 KH2 (Cole-Parmer, EUA) por 30 min. Posteriormente, os cupons foram esterilizados por radiação ultravioleta. A confirmação da esterilização foi feita incubando-se um cupom em caldo LB e verificando se houve turvação do meio após 24 h a 37 °C.

#### **3.5.2 Condicionamento das superfícies**

Cupons esterilizados foram imersos em placas de 24 poços contendo caldo LB suplementado com soluções em concentrações subinibitórias de nisina (2,01 mg/L), hipoclorito de sódio (1.500,00 mg/L) e ácido peracético (0,40 mg/L). Após 24 h a 37 °C, os cupons foram removidos das placas e deixados secar ao ar e próximos à chama em cabine de fluxo laminar. Cupons sem nenhum condicionamento e condicionados apenas com o meio de cultura foram utilizados como controle.

### **3.6 Avaliação da hidrofobicidade da superfície dos cupons**

#### **3.6.1 Medida do ângulo de contato**

Os ângulos de contato entre a superfície dos cupons de poliestireno, condicionados ou não com nisina e sanitizantes, e a água ultra-pura, formamida (LGC Bio, Brasil) e  $\alpha$ -bromonaftaleno (Merck, Alemanha) foram determinados utilizando um goniômetro (Kruss, Alemanha). Os ângulos foram medidos a cada segundo durante 30 s a partir de gotas de 2,0  $\mu$ L. A determinação da tensão interfacial total e a energia livre total da interação entre as moléculas da superfície foi realizada de acordo com Van Oss e Giese (1995); Araújo *et al.* (2009) e Pimentel-Filho *et al.* (2014).

### **3.7 Avaliação da adesão de *S. aureus* em superfície de poliestireno condicionada com nisina**

Para verificar o efeito de nisina sobre a adesão de *S. aureus* em cupons de

poliestireno, foi preparada uma cultura mista contendo as três diferentes estirpes de *S. aureus* descritas na Tabela 1. As culturas foram cultivadas separadamente em caldo LB conforme descrito no item 3.1 e, em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 min a 4 °C e lavadas duas vezes utilizando solução salina 0,85 %. O centrifugado foi resuspenso em meio sintético (Gertz *et al.*, 2009).

Cupons de poliestireno foram condicionados com a bacteriocina nisina conforme descrito no item 3.5.2. A concentração de nisina escolhida para o teste de adesão foi 0,40 mM, pois de acordo com resultados de Pimentel-Filho *et al.* (2014), esta concentração foi considerada subinibitória porém, capaz de reduzir a adesão de *S. aureus* sobre cupons de poliestireno em meio sintético. Cupons sem nenhum condicionamento foram utilizados como controle. O método da avaliação de adesão foi adaptado a partir dos estudos conduzidos por Dat *et al.* (2014).

Os cupons foram imersos em meio sintético contendo uma suspensão de 10<sup>8</sup> UFC/mL da cultura mista de *S. aureus*. Após 30, 60 e 180 min, os cupons foram retirados do meio de cultivo, lavados cuidadosamente com água destilada esterilizada e, posteriormente, colocados em tubos de ensaio com 1 mL de PBS e deixados por 30 min em banho ultrassom para remoção das células aderidas. Após esse período, a suspensão foi homogeneizada e uma alíquota foi retirada para o preparo de diluições decimais, que foram plaqueadas pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) em ágar PCA. Após incubação entre 12 e 24 h a 37 °C, a contagem das colônias foi feita em microscópio estereoscópio.

### **3.8 Avaliação do crescimento de *S. aureus* na presença de antimicrobianos**

Para verificar o perfil de crescimento de *S. aureus* na presença dos antimicrobianos, nisina, hipoclorito de sódio e ácido peracético foram combinados em concentrações subinibitórias. Células de *S. aureus* foram previamente cultivadas separadamente em caldo LB por 18 h a 37 °C. A cultura mista foi preparada homogeneizando-se partes iguais de cada cultura com a respectiva DO<sub>600nm</sub> padronizada em 0,1 e transferidas para microplacas de poliestireno contendo caldo LB suplementado com as diferentes combinações de antimicrobianos. As microplacas foram incubadas a 37 °C em leitor de microplacas modelo 1510 (Thermo Fisher Scientific, Finlândia) e o crescimento monitorado medindo-se a DO<sub>600nm</sub> a cada 30 min precedidos de 10 s de homogeneização durante 46 h. Após o período de incubação, lâminas de Gram foram

preparadas e observadas por microscopia ótica, modelo cx40 (Olympus Optical, Japão) para verificar se os antimicrobianos tinha efeito sobre a forma e arranjo das células de *S. aureus*.

### **3.9 Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. na presença de antimicrobianos**

O efeito da combinação dos antimicrobianos sobre a adesão de *Staphylococcus* spp. foi avaliado utilizando-se as placas preparadas como descrito no item 3.7.1. Após as 46 h de incubação, o meio de cultivo foi descartado e as células aderidas à superfície coradas por 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1 % (m/v). Posteriormente, o cristal violeta foi removido e os poços foram lavados por três vezes com água destilada. As placas foram secas por 15 min em estufa a 40 °C. Em seguida, 200 µL de álcool 95 % (v/v) foram adicionados a cada poço e a DO do extrato de cristal violeta foi determinada em leitor de microplacas a 590 nm (DO<sub>590nm</sub>).

### **3.10 Caracterização da composição do biofilme de *S. aureus* na presença e ausência de nisina**

O teor dos três principais componentes que constituem a matriz dos biofilmes de *S. aureus* polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, foram avaliados utilizando-se (i) meta-periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, Alemanha) capaz de degradar as ligações β-1,6-polissacáridicas, (ii) proteinase K (Promega, EUA) para degradar proteínas, e (iii) DNase I (Sigma-Aldrich, Alemanha) para degradar o DNA. O experimento foi realizado em microplacas de poliestireno contendo 96 poços. A cultura mista de células de *S. aureus* foi inoculada em caldo LB e os biofilmes foram formados durante 48 h de incubação 37 °C. Após esse período, o conteúdo da placa foi descartado restando assim, apenas o biofilme. Os poços foram lavados três vezes com PBS e tratados por 24 h a 37 °C com (i) 40 mM de NaIO<sub>4</sub> em água bidestilada, (ii) 0,1 mg/mL de protease K em 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) com 100 mM de NaCl, ou (iii) 0,5 mg/mL de DNase I em 5 mM de MgCl<sub>2</sub> (FREDHEIM *et al.*, 2009). A porcentagem de células aderidas foi determinada por leitura de DO<sub>590nm</sub> em leitor de microplacas modelo 1510 (Thermo Fisher Scientific, Finlândia) após as placas serem lavadas e coradas com cristal violeta 0,1 % (m/v) conforme descrito por Conway *et al.* (2002).

Os ensaios de desprendimento foram realizados em três repetições e em quadruplicata e foi calculado em percentual com base na diferença entre a  $DO_{590nm}$  das médias dos poços tratados e dos poços controle (FREDHEIM *et al.*, 2009).

### **3.11 Avaliação da estrutura dos biofilmes de *Staphylococcus* por microscopia confocal de varredura a laser na presença e ausência de nisina**

Biofilmes foram formados por 46 h a 37 °C sobre cupons de poliestireno imersos em caldo LB inoculado com a cultura mista de células de *S. aureus* na presença e ausência de nisina na concentração de 2,01 mg/L. Após o período de formação do biofilme, os cupons foram lavados duas vezes por imersão em PBS (0,2 M; pH 7,2) e incubados na ausência de luz por 15 min com mistura de 20 µg/mL de iodeto de propídeo (IP) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 2 µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, Alemanha) em PBS (0,2 M; pH 7,2) preparada imediatamente antes do uso. Após incubação, os cupons foram lavados por imersão em PBS e analisados em Microscópio confocal de varredura a laser modelo LSM 510 META (Zeiss, Alemanha) utilizando o laser Argônio com comprimento de onda de 458 e 514 nm. As células com coloração esverdeada foram consideradas vivas e aquelas que apresentaram-se amareladas ou avermelhadas foram consideradas mortas (WANG *et al.*, 2012).

### **3.12 Análises dos dados**

Todos os experimentos foram realizados em três repetições biológicas e três repetições técnicas, exceto a caracterização da composição do biofilme que foi feito em três repetições biológicas e quatro repetições técnicas.

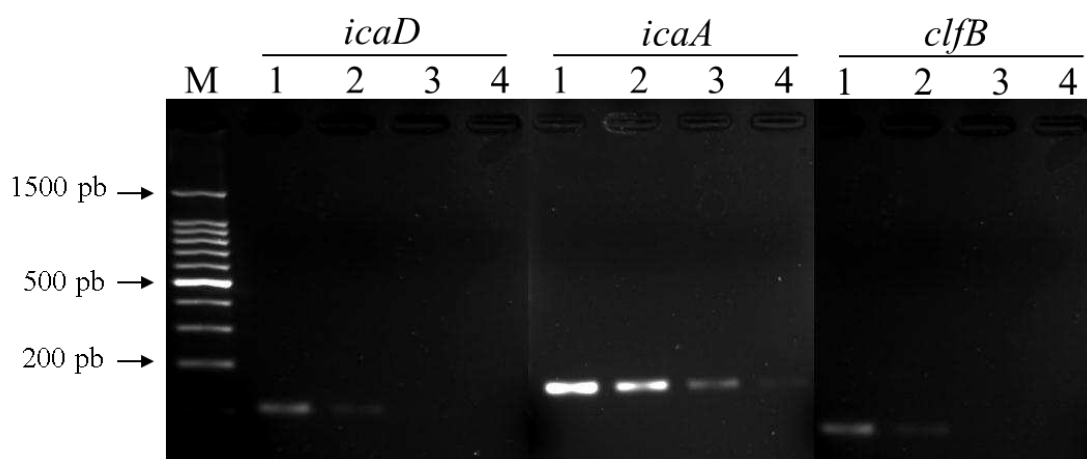
As médias dos resultados dos experimentos de adesão foram submetidas ao teste *t* de Student a 5 % de significância utilizando-se o software Microsoft Excel. Valor *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O experimento de composição do biofilme foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Cada espécie foi analisada separadamente e os dados submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Tukey, a 5% de significância. As análises foram executadas no software R (R Development Core Team, 2013).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Presença de genes envolvidos na adesão e formação de biofilme de *Staphylococcus* spp.

A técnica de de PCR foi realizada para verificar a presença de importantes genes envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. Os três genes avaliados, *icaA*, *icaD* e *clfB*, foram encontrados em *S. aureus* COL e FRI 722 (Figura 1). Em *S. aureus* Embrapa 4018 e em *S. epidermidis*, apenas o gene *icaA* foi identificado.



**Figura 1** Presença dos genes *icaA*, *icaD* e *clfB* em *Staphylococcus* spp. verificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Número da canaleta, seguida pela identificação: M- marcador molecular; 1- *S.aureus* COL; 2- *S.aureus* FRI 722; 3- *S.aureus* Embrapa 4018; 4- *S. epidermidis* ATCC 35984.

Os genes *icaA* e *icaD* identificados em *S. aureus* COL e FRI 722 estão relacionados com a formação da matriz do biofilme e fazem parte de um operon composto pelos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* que é responsável por gerar PIA, um polissacarídeos de adesão intercelular. Os genes *icaA* e *icaD* são frequentemente encontrados em estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* formadores de biofilme (HEILMANN *et al.*, 1996; CRAMTON *et al.*, 1999; YAZDANI *et al.*, 2006). O gene *clfB* também identificado nas estirpes COL e FRI 722 de *S. aureus* parecer ser, segundo Foster (2009) e Mulcahy *et al.* (2012), responsável por mediar a adesão e aglutinação bacteriana ao fibrinogênio, podendo causar sérios danos, principalmente no setor hospitalar, pois pode haver a formação de biofilmes em materiais biológicos, como válvulas cardíacas e cateteres, entre outros.

Embora os resultados mostrem que, dos três genes avaliados, apenas *icaA* foi

identificado em *S. epidermidis*, esta estirpe vem sendo referenciada em muitos estudos como forte produtora de biofilmes (MACK *et al.*, 1996, HUSSAIN *et al.*, 1997, VUONG *et al.*, 2004). Por esse motivo, é frequentemente usada nos ensaios de adesão e formação de biofilme (APARNA e YADAV, 2008; FEY e OLSON, 2011; KAISER *et al.*, 2013). A não identificação dos genes relacionados à adesão e formação de biofilme pode estar relacionada com a sequência do gene utilizada. Os bancos de dados mostram que os genes *icaA*, *icaD*, são bem conservados em *S. aureus*, entretanto, eles apresentam uma baixa homologia com *S. epidermidis*.

#### 4.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de nisina e dos sanitizantes sobre *Staphylococcus*

A determinação do MIC dos antimicrobianos nisina, hipoclorito de sódio e ácido peracético das três estirpes de *S. aureus* e para *S. epidermidis* ATCC 35984 foi realizada em meio LB e o resultado encontra-se na Tabela 4.

**Tabela 4** Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antimicrobianos para *S. aureus* e *S. epidermidis*

Estirpes/Espécie	MIC dos antimicrobianos (mg/L)		
	Nisina	Hipoclorito de sódio	Ácido Peracético
<i>S. aureus</i> COL	9,38	3.000	0,60
<i>S. aureus</i> FRI 722	4,02	3.500	2,40
<i>S. aureus</i> Embrapa 4018	4,02	3.500	2,40
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	4,02	3.000	0,80

Dentre as culturas avaliadas, *S. aureus* COL foi a que apresentou maior resistência à nisina, enquanto as demais, *S. aureus* FRI 722, *S. aureus* Embrapa 4018 e *S. epidermidis* ATCC 35984, tiveram o mesmo perfil de sensibilidade à bacteriocina nisina. Esta resistência elevada da estirpe COL de *S. aureus* à nisina e à bacteriocina bovicina HC5 também foi verificada por Pimentel-Filho *et al.* (2014).

As diferenças dos valores de MIC entre os isolados mostram a variabilidade no perfil de sensibilidade entre as estirpes de uma mesma espécie aos antimicrobianos avaliados. Segundo Melchior *et al.* (2007), cada estirpe requer um tempo de exposição específico para cada antimicrobiano. A variação no perfil de sensibilidade de diferentes

estirpes de *S. aureus* isoladas de fontes diversas à presença de nisina também foi reportada por Cruz (2009) e Pimentel-Filho *et al.* (2013). Vázquez-Sánchez *et al.* (2014) mostraram a existência de um perfil diferente de resistência e sensibilidade entre as diferentes estirpes de *S. aureus* isolados de pescados testados, em resposta aos sanitizantes cloreto de benzalcônio, ácido peracético e hipoclorito de sódio testados, tanto sobre as células em estado planctônico quanto em biofilmes. Esses autores sugeriram a necessidade do uso de uma grande coleção de estirpes para a avaliação da atividade bactericida dos desinfetantes para assegurar que eles estão sendo aplicados corretamente (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

Entre os três antimicrobianos avaliados neste estudo, o ácido peracético foi o mais efetivo no controle de *S. aureus*. No Brasil, o hipoclorito de sódio ainda é o agente sanitizante mais frequentemente empregado nas indústrias de alimentos. No entanto, já existe um consenso sobre as vantagens do ácido peracético, uma vez que esta substância não reage com a matéria orgânica para a produção de compostos tóxicos ou carcinogênicos além de ter baixo impacto ambiental e ser indicado como potencialmente ativo no controle de biofilmes (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

Com base nos valores de MIC obtidos foram determinadas as concentrações subinibitórias para os ensaios posteriores. Para tal, escolheu-se uma concentração mediana comum, capaz de permitir o crescimento de todas as estirpes estudadas o que tornaria possível avaliar seu efeito sobre a adesão e formação de biofilme sem, contudo impedir o crescimento. As concentrações subinibitórias de cada antimicrobiano definidas para a continuação do estudo estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5** Concentração subinibitória dos antimicrobianos avaliados contra estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Antimicrobianos	Concentrações subinibitórias (mg/L)
Nisina	2,01
Hipoclorito de sódio	1.500
Ácido peracético	0,4

### **4.3 Efeito do condicionamento de cupons de poliestireno com antimicrobianos sobre a hidrofobicidade da superfície**

A medida do ângulo de contato entre as diferentes substâncias e a superfície de poliestireno condicionada com os antimicrobianos foi realizada para verificar a modificação da hidrofobicidade da superfície pelos antimicrobianos usados neste estudo. As medidas dos ângulos de contato e os cálculos da energia livre de interação total ( $\Delta G$  total) dos cupons condicionados por 18 h com os antimicrobianos em meio LB estão apresentados na Tabela 6. A superfície de poliestireno foi considerada hidrofóbica por apresentar um ângulo de contato entre a água e a superfície maior que  $65^\circ$ . Segundo Vogler (1998), a medida utilizando-se a água é considerada um método qualitativo sendo a superfície classificada como hidrofóbica aquela que apresenta um ângulo de contato superior a  $65^\circ$ , enquanto valores inferiores a este indicam um perfil hidrofílico da superfície. Biazar *et al.* (2011) determinaram o ângulo de contato da água com a superfície de poliestireno de  $90,1^\circ$  caracterizando a hidrofobicidade dessa superfície. Considerando os cálculos da energia livre de Gibbs total ( $\Delta G$  total) pelo método quantitativo (ARAÚJO *et al.*, 2009), se o  $\Delta G$  for menor que zero a superfície é classificada como hidrofóbica e se o valor de  $\Delta G$  for superior a zero a superfície é classificada como hidrofílica, foi confirmado o perfil hidrofóbico da superfície de poliestireno sem nenhum condicionamento.

O condicionamento da superfície de poliestireno utilizando apenas o meio de cultura LB foi suficiente para mudar o perfil de hidrofobicidade da superfície uma vez que reduziu os ângulos de contato e aumentou a energia livre de Gibbs (Tabela 6). Em ambos os critérios analisados, qualitativo e quantitativo, a superfície condicionada passou a ser classificada como hidrofílica e esta hidrofília foi mantida após o condicionamento com os antimicrobianos nisina, hipoclorito de sódio e ácido peracético (Tabela 6).

A hidrofobicidade é uma propriedade importante e representa a molhabilidade, ou seja, a capacidade de um líquido manter contato com uma superfície. Se duas superfícies são hidrofóbicas, torna-se mais fácil eliminar a camada de água porque as moléculas de superfícies têm menos atração pelas moléculas de água e maior interação entre elas mesmas, entretanto se essas superfícies são hidrofílicas ocorre o contrário (TEIXEIRA *et al.*, 2005 ARAÚJO *et al.*, 2009). Portanto, superfícies hidrofílicas desfavorecem o processo de adesão microbiana. De fato, Teixeira *et al.* (2005)

confirmaram que a adesão de alguns isolados de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus sciuri* foi favorável no aço inoxidável e borracha, que são considerados hidrofóbicos e desfavorável em superfícies de vidro e polimetilacrilato, definidos como hidrofílicos. Di Ciccio *et al.* (2015) avaliaram a adesão de *S. aureus* ATCC 35556, considerada uma estirpe de referência positiva para formação de biofilme, em duas superfícies definidas como hidrofóbicas e outra hidrofílica, por microscopia eletrônica de varredura e verificaram que em superfícies hidrofóbicas, como o poliestireno, as células formaram um biofilme espesso, enquanto na superfícies hidrofílica, o aço inoxidável, houve uma colonização parcial com apenas pequenos agregados celulares. Esses trabalhos citados são controversos sobre a hidrofobicidade do aço inoxidável, mas Flint *et al.* (2000) realizaram medidas de ângulo de contato desse material e encontraram valor de 85°, resultado que foi semelhante ao encontrado por Araújo *et al.* (2009), o que classifica o aço inoxidável como uma superfície hidrofóbica.

**Tabela 6** Médias e desvios-padrão das medidas de ângulo de contato de água ( $\Theta_w$ ) e a energia livre de interação total ( $\Delta G$  total) de superfície de poliestireno

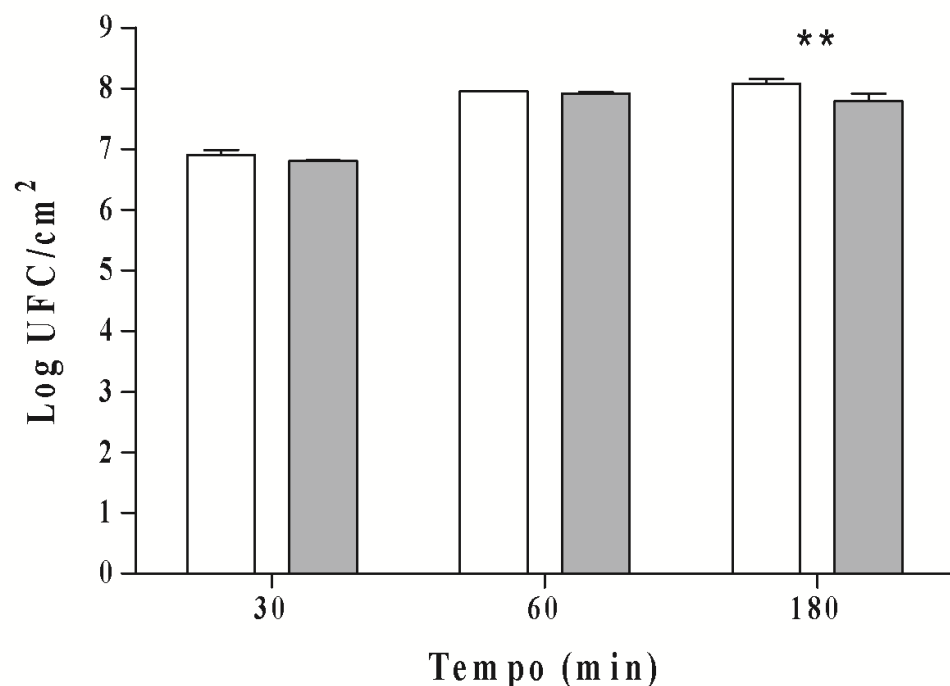
Forma de condicionamento	Ângulo de contato (°)	$\Delta G$ total
	$\Theta_w$	(mJ/m <sup>2</sup> )
Sem condicionamento	88,5 ± 0,7	-27,50
Caldo LB	16,3 ± 1,0	31,91
Caldo LB + nisina	13,4 ± 0,6	50,01
Caldo LB + hipoclorito	18,0 ± 1,3	41,54
Caldo LB + ácido peracético	4,7 ± 0,4	46,97

Pimentel Filho *et al.* (2014) verificaram que o processo de adesão de *S. aureus* em superfície de poliestireno condicionada com as bacteriocinas nisina e bovicina HC5 em meio sintético foi considerado desfavorável pelo aumento da hidrofília da superfície tratada. Entretanto, o meio sintético usado por esses autores não foi capaz de alterar a hidrofobicidade da superfície sendo esta mudança atribuída apenas à presença das bacteriocinas. Esses resultados sugerem que o meio de cultivo é um importante fator a ser considerado em experimentos para avaliar a formação de biofilme. A modificação do perfil hidrofóbico causado apenas pelo meio de cultura LB pode ter interferido na avaliação do efeito dos tratamentos com os antimicrobianos sobre a superfície. Entretanto, optou-se por não usar o meio sintético uma vez que, em experimentos preliminares, verificou-se que as estirpes FRI e EMBRAPA de *S. aureus* não cresciam

bem neste meio. Assim, o meio sintético foi usado apenas nos experimentos de adesão, que não dependiam de multiplicação celular e o meio LB nos experimentos de formação de biofilmes, uma vez que nesta última condição, era necessário o crescimento microbiano.

#### **4.4 Efeito do condicionamento da superfície de poliestireno com antimicrobianos sobre a adesão de *S. aureus***

Os ensaios de adesão de *S. aureus* em cupons de poliestireno foram realizados para verificar o efeito do condicionamento da superfície com nisina em meio sintético. Resultados apresentados na figura 2 mostram que a adesão aumenta com de acordo com que o tempo de incubação vai aumentando e que na primeira hora, o condicionamento da superfície com nisina não interferiu ( $p > 0,05$ ) na adesão das células. Após três horas de incubação em meio sintético, a adesão de *S. aureus* foi menor ( $p < 0,05$ ) em cupons condicionados com nisina. Os resultados confirmaram que o condicionamento com nisina pode exercer um efeito redutor no processo de adesão de *S. aureus* em superfícies de poliestireno e que o tempo de adesão é um importante fator a ser considerado. Nostro *et al.* (2010) incorporaram diferentes concentrações de nisina em filmes de etileno acetato de vinila (EVA) para avaliar o efeito na capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Os resultados mostraram que a nisina presente nos filmes plásticos foi eficaz na redução da formação de biofilmes na superfície apresentando-se mais efetiva contra *S. epidermidis* do que contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Pimentel-Filho *et al.* (2014) também verificaram que, na presença de concentrações subinibitórias das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina no meio sintético, estirpes de *S. aureus* aderiram menos em placas de poliestireno após 18 h de incubação.



**Figura 2** Número de células de *S. aureus* aderidas em cupons condicionados e não condicionados com nisina. Cupons condicionados com 0,4 mM (1,34 mg/L) de nisina (barras cinzas) foram submersos em meio sintético inoculado com  $10^6$  UFC/mL de uma cultura mista de *S. aureus* e o número de células aderidas foi determinado após 30, 60 e 180 min de incubação a 37 °C. Cupons sem condicionamento (barras brancas) foram usados como controle. \*\*  $p < 0,05$  (Teste T de Student).

#### **4.5 Efeito dos antimicrobianos sobre o crescimento e a formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. em poliestireno**

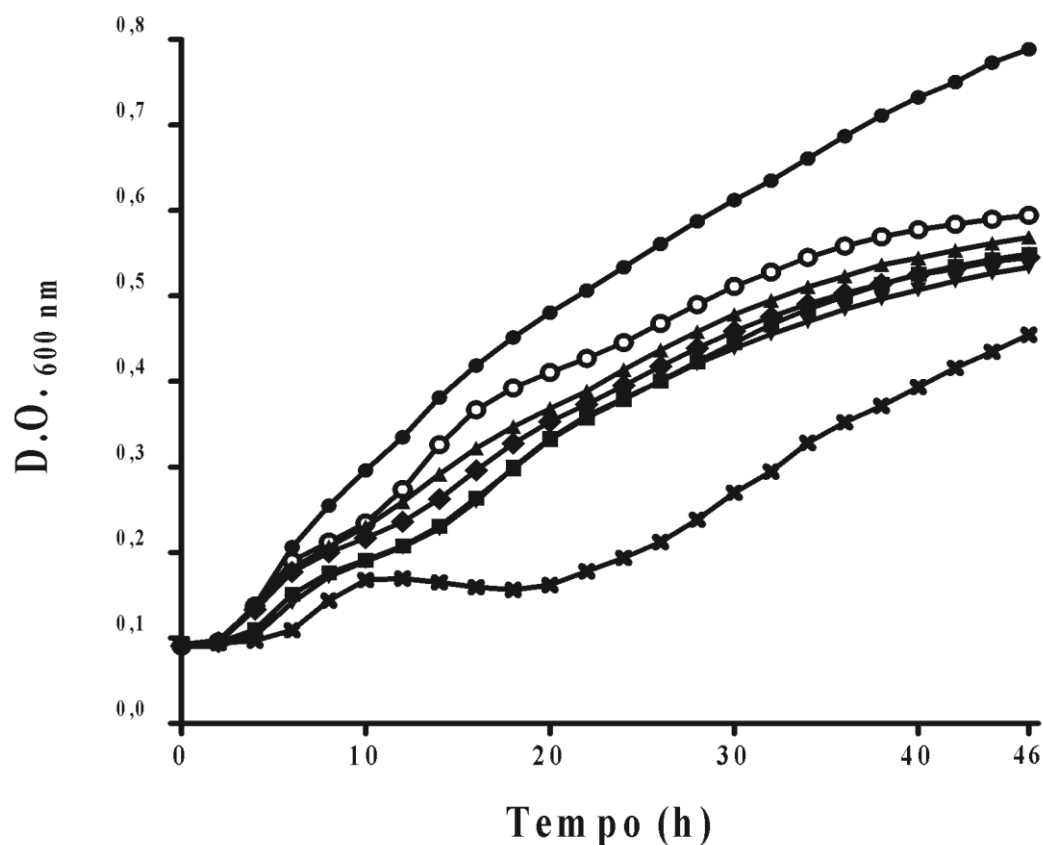
O efeito da adição dos antimicrobianos nisina, hipoclorito de sódio e ácido peracético isoladamente e combinados em concentrações subinibitórias no meio LB sobre o crescimento da cultura mista de estirpes de *S. aureus* foi avaliado em microplacas de poliestireno. Entre os antimicrobianos testados, o ácido peracético foi o mais efetivo na redução do crescimento da cultura mista de *S. aureus*, principalmente quando utilizado individualmente se comparado ao uso combinado com os outros antimicrobianos (Figura 3).

A adição de concentração subinibitória de nisina individualmente no meio de cultivo parece estimular o crescimento da cultura mista de *S. aureus* (Figura 3). A coloração de Gram foi feita em uma amostra do cultivo para verificar se havia alteração na morfologia e arranjo das células de *S. aureus* quando expostas à bacteriocina. Não foi observada diferença na morfologia celular, porém, as células de *S. aureus* na ausência

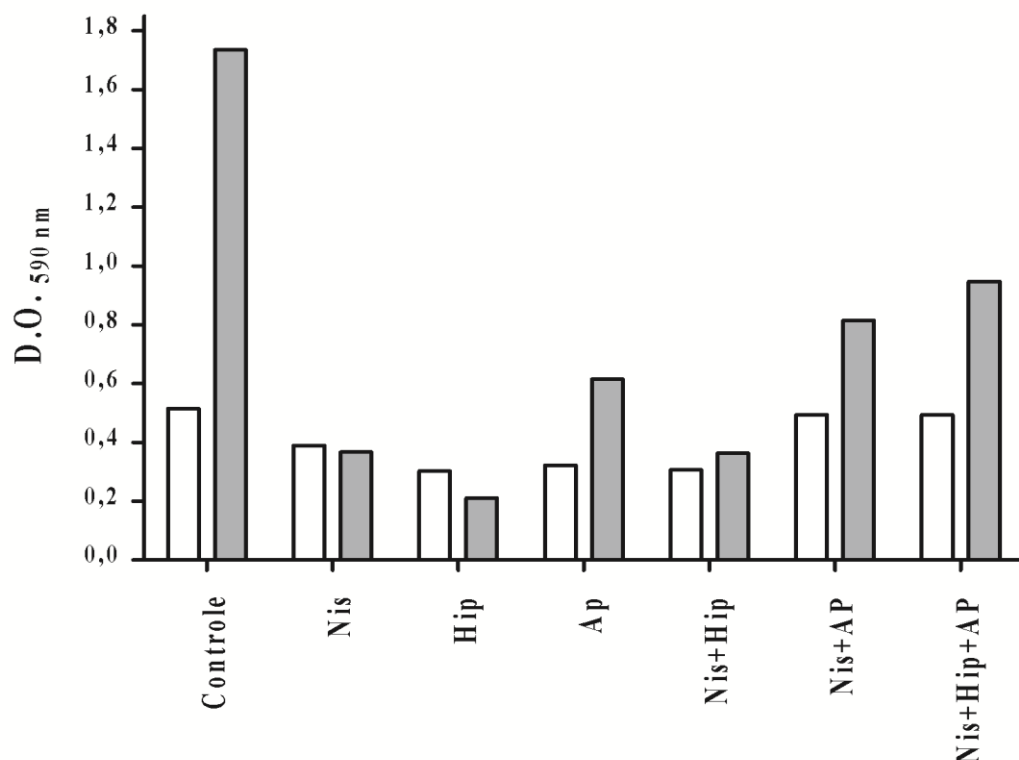
de nisina se apresentaram agrupadas no arranjo celular característico deste gênero bacteriano, se comparado com o tratamento com nisina, no qual as células se apresentam desagregadas, ou seja, isoladas com maior frequência. Assim, uma possível explicação para o aparente estímulo de crescimento seja o efeito da nisina, em concentração subinibitória, em desestabilizar o arranjo das células, contribuindo assim para um aumento de células na suspensão e aumentando a quantidade de luz emergente, não dispersa.

Os demais antimicrobianos, hipoclorito de sódio e ácido peracético, isolados ou combinados com nisina, foram capazes de reduzir o crescimento de *S. aureus*, quando comparado com o controle. Os experimentos foram conduzidos em concentrações subinibitórias e podem sugerir que a utilização indevida de agentes biocidas pela indústria de alimentos em curtos períodos de exposição e com doses subletais pode provocar um aumento na incidência ou até mesmo o surgimento de estirpes resistentes aos antimicrobianos (GIBSON *et al.*, 1999; LANGSRUD *et al.*, 2003). No entanto, na prática, diferentes desinfetantes com semelhantes mecanismos de ação e alvos celulares são muitas vezes aplicados, o que aumenta o risco de resistência cruzada, particularmente em biofilmes (BRAOUDAKI e HILTON, 2004; SAÁ-IBUSQUIZA *et al.*, 2011).

A ação da nisina, do hipoclorito de sódio e do ácido peracético também foi avaliada sobre a formação de biofilmes em microplacas de poliestireno utilizando a técnica do cristal violeta. Os antimicrobianos testados, em geral, diminuíram a adesão e a formação de biofilmes pela cultura mista de *S. aureus* e por *S. epidermidis* sendo, o hipoclorito de sódio, o antimicrobiano mais efetivo para o biofilme de *S. epidermidis* (Figura 4). Embora o ácido peracético tenha exercido maior efeito inibidor no crescimento de *S. aureus* (Figura 3), a formação de biofilme foi reduzida de maneira similar a dos outros antimicrobianos e este efeito redutor foi menos intenso quando houve a combinação com nisina (Figura 4).



**Figura 3** Crescimento da cultura mista de *S. aureus* na presença de antimicrobianos adicionados isoladamente ou em combinação. Meio LB suplementado com concentrações subinibitórias de nisina 2,01 mg/L (círculo fechado), hipoclorito de sódio 1500,00 mg/L (triângulo invertido fechado) ou ácido peracético 0,40 mg/L (cruz) e a combinação de nisina e hipoclorito de sódio (quadrado fechado), nisina e ácido peracético (retângulo fechado) e nisina, hipoclorito e ácido peracético (triângulo fechado) foram inoculados com uma cultura mista de *S. aureus* e incubados a 37 °C por até 46 h. Meio LB sem nenhum antimicrobiano foi usado como controle (círculo aberto).



**Figura 4** Formação de biofilme por *Staphylococcus* ssp. na presença de antimicrobianos adicionados isoladamente ou em combinação. Meio LB suplementado com concentrações subinibitórias de nisina 2,01 mg/L (Nis), hipoclorito de sódio 1500 mg/L (Hip) ou ácido peracético 0,40 mg/L (AP) e a combinação de nisina e hipoclorito de sódio (Nis + Hip), nisina e ácido peracético (Nis+AP) e nisina, hipoclorito e ácido peracético (Nis+Hip+AP) foram inoculados com uma cultura mista de *S. aureus* (Barras brancas) ou *S. epidermidis* ATCC 35984 (Barras cinzas) e incubados a 37 °C por até 46 h. Meio LB apenas com células sem antimicrobiano foi usado como controle.

A redução da formação de biofilmes de *S. aureus* e de *S. epidermidis* pelos antimicrobianos avaliados pode ser uma estratégia a ser explorada para prevenção de biofilmes em superfícies de poliestireno, uma vez que remover biofilmes formados é um processo complexo e difícil. De fato, estudos relataram a ineficiência do ácido peracético e do hipoclorito de sódio em remover completamente as células do biofilme de *S. aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno (MEIRA *et al.*, 2012). Estudo semelhante realizado por Souza *et al.* (2014) indicou que os sanitizantes ácido peracético e hipoclorito de sódio utilizados na concentração 30 mg/L e 250 mg/L, respectivamente, não foram eficientes em remover completamente as células de *S. aureus* aderidas ao polipropileno e às superfícies de aço inoxidável. Os resultados de Vázquez-Sánchez *et al.* (2014) corroboram com as citações acima, uma vez que biofilmes formados por estirpes de *S. aureus* apresentaram acentuada resistência ao cloreto de benzalcônio, ácido peracético e hipoclorito de sódio. A ação de nisina sobre

biofilmes de *S. aureus* formados em superfícies de polipropileno foi avaliada por Cabo *et al.*, (2009) que verificaram redução de 99% de células viáveis

#### **4.6 Composição do biofilme de *Staphylococcus ssp.***

Dada a importância dos três principais componentes da matriz de biofilmes bacterianos, a variação do teor de polissacarídeos, proteínas e DNA em biofilmes formados pela cultura mista de *S. aureus* e por *S. epidermidis* foi avaliada na presença e ausência de nisina. Cada componente foi avaliado tratando-se os biofilmes formados com o respectivo composto degradante do componente: metaperiodato de sódio, proteinase K e DNase I. Os valores médios da DO<sub>590nm</sub> dos biofilmes corados com cristal violeta após serem tratados com as enzimas são apresentados na Tabela 7 e representam a relação de desprendimento de células em função do tratamento.

O tratamento com nisina não causou redução significativa do biofilme total e nem na composição de proteínas do biofilme formado com a cultura mista de *S. aureus* (Tabela 7). Entretanto, houve redução significativa das DO<sub>590nm</sub> correspondentes ao desprendimento de DNA e polissacarídeos, na presença de nisina (Tabela 7).

No biofilme formado por *S. epidermidis*, nisina foi eficiente na redução do biofilme total e no conteúdo de polissacarídeos. Os valores médios de DO<sub>590nm</sub> foram significativamente superiores na ausência de nisina (Tabela 7). Não houve diferença significativa entre os valores de DO<sub>590nm</sub> relativos ao teor de DNA e proteínas, tanto na presença como na ausência de nisina.

A porcentagem de cada um dos três principais componentes do biofilme de *Staphylococcus* é apresentada na Tabela 8 e os valores representam o percentual de cada componente em relação ao biofilme total. Por exemplo, os polissacarídeos representavam cerca de 65 % do biofilme de *S. aureus* e o tratamento com nisina reduziu este percentual para 9 % (Tabela 8). O método de determinação dos componentes de biofilme usando o cristal violeta é estimativo e os valores percentuais de cada componente são variáveis. Rivas *et al.* (2007) questionaram o uso dessa técnica para quantificação de biofilmes, pois pode subestimar valores. Por esta razão, a soma das porcentagens dos componentes não totaliza 100 % em relação ao biofilme total. Deve-se considerar que, além destes componentes, os biofilmes apresentam outras substâncias complexas e variadas e que interferem com a determinação da sua composição.

**Tabela 7** Composição do biofilme de cultura mista de *S. aureus* e *S. epidermidis* ATCC 35984. Densidade ótica (590nm) correspondente a porção desprendida de cada componente do biofilme na presença e ausência de nisina (2,01 mg/l). Biofilme total, polissacarídeos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA).

Nisina	Componente							
	TOTAL		Polissacarídeos		Proteínas		DNA	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<b>Ausência</b>	0,396 <sup>a</sup>	1,216 <sup>a</sup>	0,256 <sup>a</sup>	0,850 <sup>a</sup>	0,144 <sup>a</sup>	0,476 <sup>a</sup>	0,128 <sup>a</sup>	0,437 <sup>a</sup>
<b>Presença</b>	0,258 <sup>a</sup>	0,438 <sup>b</sup>	0,023 <sup>b</sup>	0,183 <sup>b</sup>	0,124 <sup>a</sup>	0,213 <sup>a</sup>	0,059 <sup>b</sup>	0,186 <sup>a</sup>

Valores representam a média de três repetições, sendo que cada repetição foi obtida pela média de quadruplicatas. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os biofilmes são compostos por uma matriz complexa e, quando maduros, esta matriz protege as células sésseis contra estresses ambientais e agentes antimicrobianos (BRIDIER *et al.*, 2015). Em *S. aureus*, o polissacarídeo poly-N-acetil glicosamina (PNAG) é relatado na literatura pela importância de manter a integridade da arquitetura de biofilmes e sua proteção contra a ação de compostos biocidas (IZANO *et al.*, 2008). A formação de biofilme na presença de nisina resultou na redução desse componente o que pode estar associado com a menor formação de biofilme ou a desestruturação do mesmo, tornando-o mais sensível a agentes antimicrobianos.

As proteínas também estão dentre os componentes principais do biofilme, porém nisina parece não afetar sua proporção (Tabela 8). Na literatura, fibras amilóides proteicas vem sendo apontadas como um componente estrutural comum em matrizes de biofilme (DUEHOLM *et al.*, 2010 e ROMERO *et al.*, 2010). Em *S. aureus*, pequenos peptídeos chamados fenol modulinas solúveis, podem se auto-organizar em fibras de amiloide e participarem da montagem e da integridade de biofilme (SCHWARTZ *et al.*, 2012).

**Tabela 8** Percentual da composição do biofilme da cultura mista de *S. aureus* e *S. epidermidis* ATCC 35984 e, valores correspondem aos componentes desprendidos em relação ao biofilme total, na presença e ausência de nisina (2,01 mg/l).

Espécies	Componentes	Ausência de nisina	Presença de nisina
		%	%
<b>Cultura mista de <i>S. aureus</i></b>	Polissacarídeos	65	9
	Proteína	36	48
	DNA	32	23
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	Polissacarídeos	70	42
	Proteína	39	49
	DNA	36	43

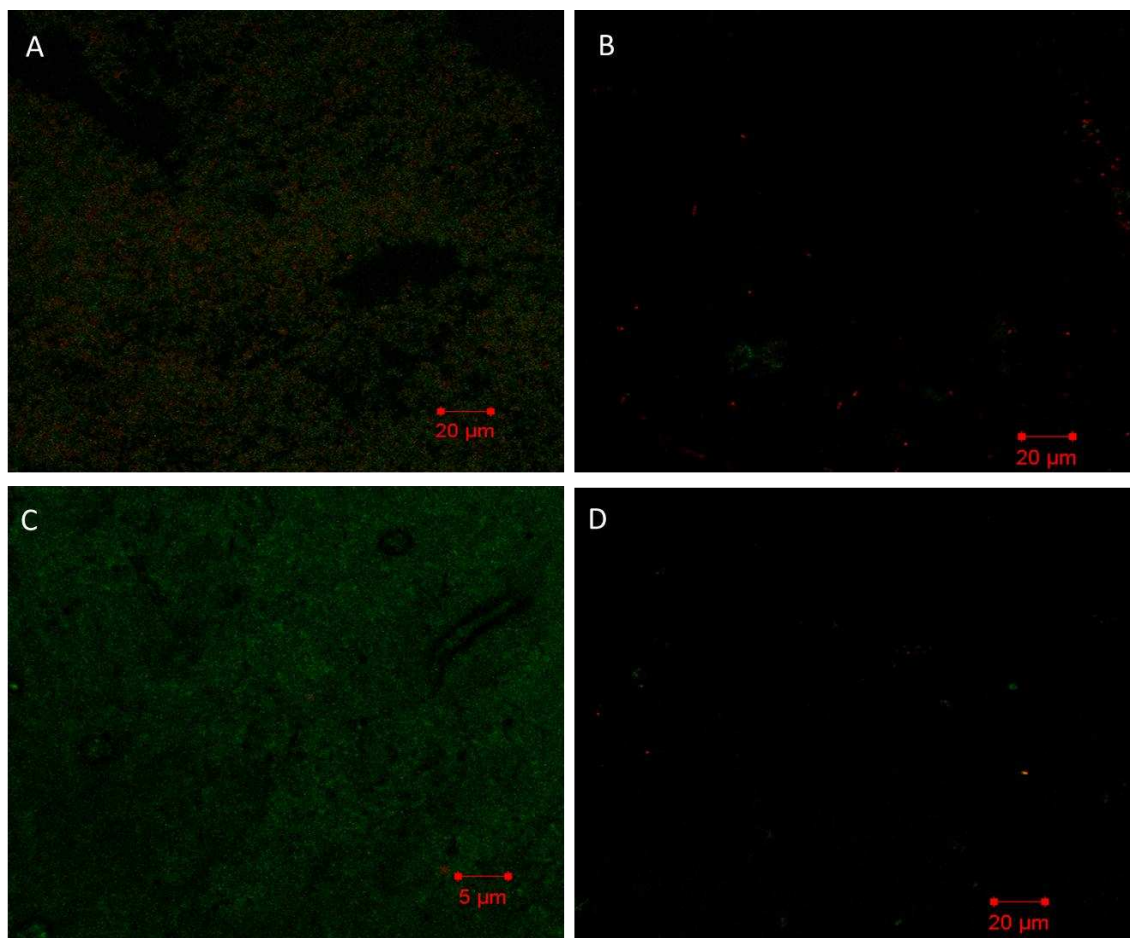
Constatou-se que o eDNA está presente nos biofilmes em menor proporção em relação aos outros componentes, polissacarídeos e proteínas. Entretanto, o eDNA parece ter função importante no biofilme de *S. aureus*, pois na presença de DNase I, enzima que degrada DNA, em um experimento feito com biofilmes pré-formados e tratados com essa enzima, mostrou que as células de *S. aureus* se tornam mais sensíveis à inativação por detergentes (IZANO *et al.*, 2008). Entretanto, o mesmo efeito não foi confirmado sobre biofilmes de *S. epidermidis*. Este mesmo estudo verificou que o DNA presente como componente da matriz do biofilme pode funcionar como adesinas intercelulares (IZANO *et al.*, 2008). Em relação à origem de DNA nos biofilmes, além do DNA extracelular, Rice *et al.* (2007) sugeriram que o DNA presente na composição do biofilme de *S. aureus* pode ser também proveniente do DNA genômico liberado a partir de células lisadas do biofilme.

Não há relatos na literatura do efeito de nisina sobre os componentes de biofilmes de *S. aureus* e os resultados apresentados contribuem para conhecer mais aprofundadamente a composição e arquitetura da matriz extracelular de biofilmes. Informações sobre a composição e arquitetura de biofilmes são bastante úteis para melhorar a eficiência de estratégias de desinfecção. No entanto, os biofilmes são altamente complexos e a extração e a purificação de componentes da matriz extracelular são trabalhosas, de forma que ainda é um desafio traçar um perfil bioquímico completo dos biofilmes (FLEMMING *et al.*, 2007).

#### **4.7 Estrutura dos biofilmes de *Staphylococcus* spp. avaliados por microscopia confocal de varredura a laser**

Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser foram utilizadas para observar a estrutura dos biofilmes em seu estado hidratado. Neste ensaio, a viabilidade celular foi evidenciada pelos fluoróforos iodeto de propídeo e fluoresceína isotiocianetada (FITC). Ambos os corantes penetram nas células viáveis e não viáveis. Entretanto, células vivas são capazes de expulsar o iodeto de propídeo. Assim, apenas o FITC permanece no interior das células vivas conferindo uma coloração esverdeada. Em células mortas, o vermelho intenso do iodeto de protídeo sobrepõe-se ao verde do FITC. Sendo assim, células com coloração avermelhada ou alaranjada são consideradas mortas (DONLAN, 2002; WANG *et al.*, 2012).

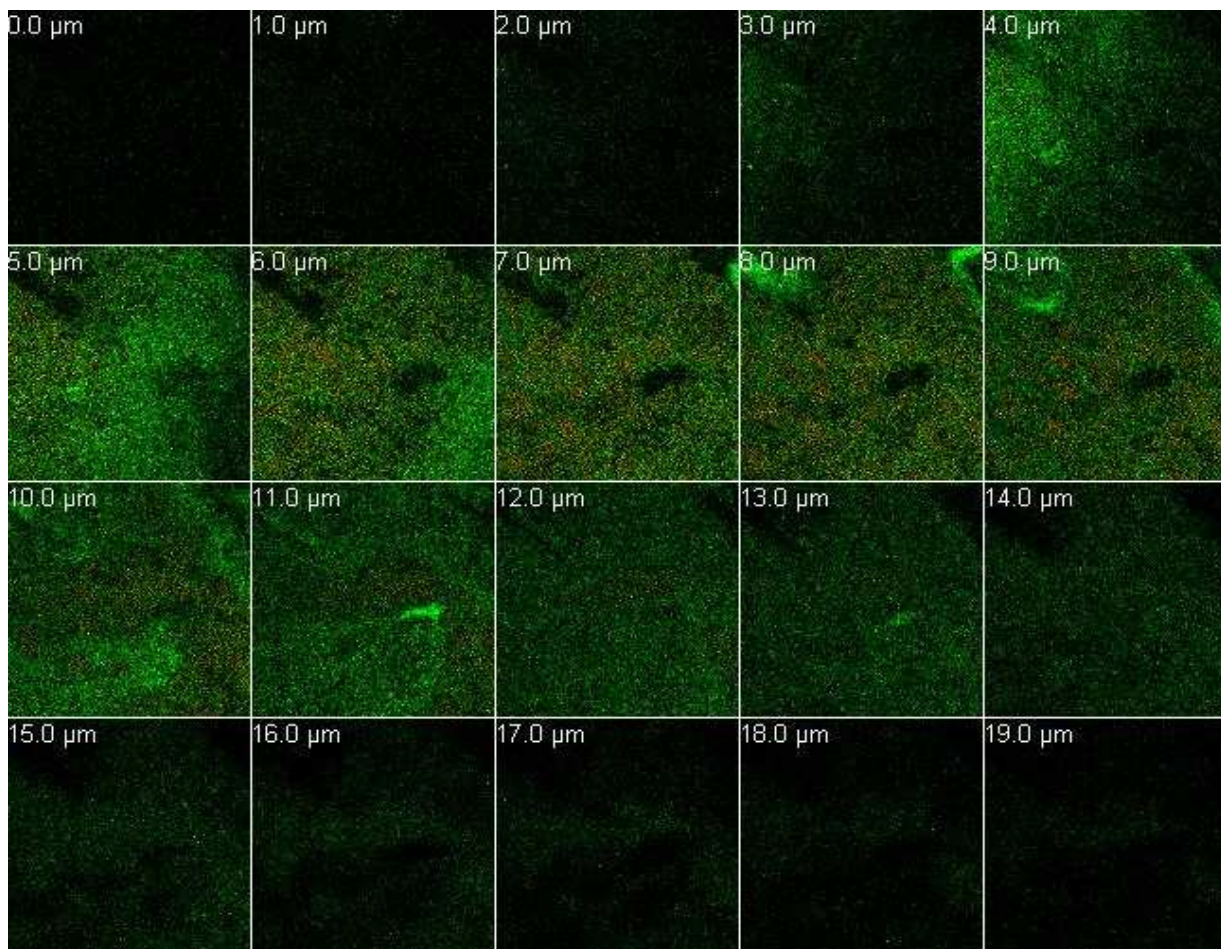
As imagens obtidas dos tratamentos controles, sem adição de nisina (Figura 5A e C) mostram um equilíbrio de células vivas e células mortas no biofilme. Por outro lado, é possível observar uma diminuição na formação do biofilme (Figura 5B e D) quando os cupons de poliestireno foram submersos em meio de cultura contendo nisina em concentração subinibitória. A bacteriocina foi mais eficaz na redução do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984, confirmando os resultados da análise da composição do biofilme desta estirpe (Tabela 7).



**Figura 5** Imagens de microscopia confocal a laser. Biofilme de 46 horas da cultura mista de *S. aureus* (A); Cultura mista de *S. aureus* na presença de nisina (B); *S. epidermidis* ATCC 35984(C) *S. epidermidis* ATCC 35984 na presença de nisina (D).

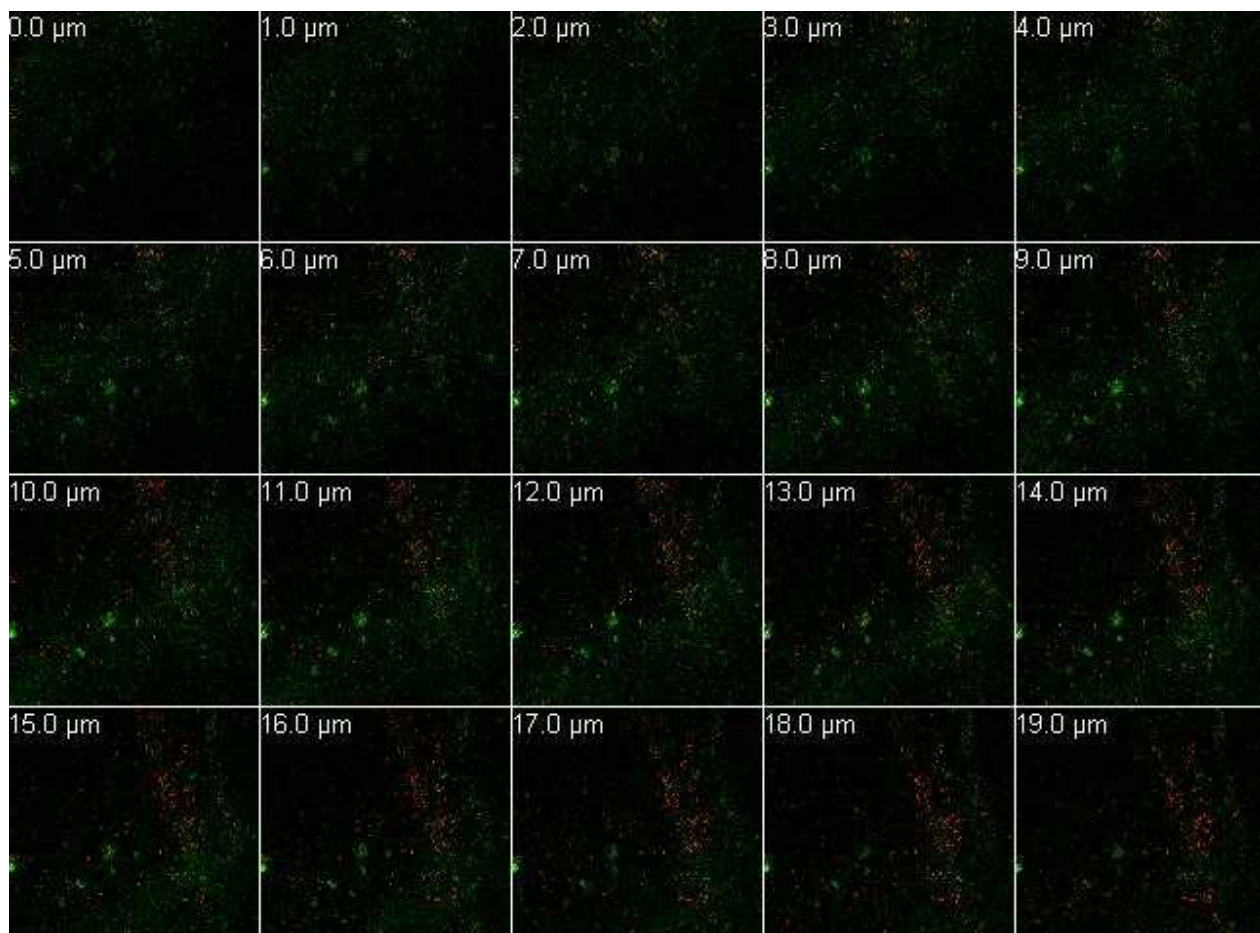
As imagens também confirmam os dados previamente obtidos nos experimentos de adesão realizados em microplacas de poliestireno quando a adição de nisina foi capaz de diminuir a adesão e a formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. (Figura 5 e Tabela 7).

Uma sequência de cortes no biofilme foi feita para observar todas as partes da estrutura do biofilme, desde a base até o topo passando pelo seu interior (Figuras 6 e 7). Para tal, a ferramenta “z-stack” do software LSM 510 META (Zeiss, Alemanha) foi aplicada à imagem gerando fatias do biofilme com cortes padronizados em 1 µM. Por meio das imagens é possível observar claramente a redução do biofilme formado na presença de nisina. No biofilme formado pela cultura mista de *S. aureus* (Figura 7) na presença de 2,01 mg/L de nisina, observa-se a estrutura de biofilme, mas com agrupamento de células mais espaçadas e, além disso, a existência de maior quantidade de células mortas no interior do biofilme



**Figura 6** Imagens de microscopia confocal a laser. Biofilme de 46 horas da cultura mista de *S. aureus* na ausência de nisina (2,01 mg/l),

A bacteriocina parece exercer um efeito na desagregação das células do biofilme reduzindo assim, o tamanho de sua estrutura. Outro fator que pode contribuir para essa diminuição do biofilme é a mudança de hidrofobicidade da superfície de poliestireno causada pela presença do peptídeo antimicrobiano. Estudos conduzidos por Pimentel-Filho *et al.* (2014) atribuem a redução da adesão de células de *S. aureus* à superfície de poliestireno à mudança do perfil de hidrofobicidade da superfície quando exposta às bacteriocinas nisina e bovicina HC5.



**Figura 7** Imagens de microscopia confocal a laser. Biofilme de cultura mista de *S. aureus* de 46 horas em superfície de poliestireno na presença de nisina (2,01 mg/l).

## 5 CONCLUSÃO

Nisina mostrou-se eficaz na redução da adesão de células de *S. aureus* em superfícies de poliestireno condicionadas com a bacteriocina. Os sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético, mostraram-se eficientes na redução da formação do biofilme, quando, em concentrações subinibitórias, entretanto, a combinação com nisina não reduziu a formação dos biofilmes. A ideia de combinar compostos antimicrobianos para controlar o desenvolvimento de biofilmes surge como uma alternativa aos métodos convencionais, entretanto, estudos com diferentes concentrações e combinações de diferentes antimicrobianos devem ser feitos uma vez que nisina combinada com os sanitizantes em baixas concentrações foi menos efetiva do que cada antimicrobiano utilizado isoladamente. Além disso, a proposta de combinar agentes antimicrobianos sugere a redução da utilização de compostos corrosivos na limpeza e sanitização de superfícies, diminuindo os riscos à saúde dos trabalhadores e prejuízos ao meio ambiente.

Conhecer a composição do biofilme é importante na busca por novos agentes antimicrobianos e, ou alvos alternativos para efetivo controle. Dos componentes quantificados neste estudo, os polissacarídeos foram os que sofreram maior redução na presença de nisina, reforçando a ideia de que a bacteriocina é capaz de reduzir biofilmes de *Staphylococcus* spp. também por alterar sua composição. Os resultados da microscopia confirma a hipótese que nisina em concentrações subinibitórias pode reduzir a formação de biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* em superfície de poliestireno.

Outros estudos devem ser realizados objetivando ampliar o conhecimento sobre o efeito de compostos antimicrobianos em biofilmes e assim, propor novas estratégias de controle como, por exemplo, incorporação de agentes antimicrobianos nos materiais da superfície e avaliação das modificações de suas propriedades físico-químicas, dentre outras, buscando alternativas eficazes para evitar, ou pelo menos reduzir, o risco da formação de biofilme e de resistência antimicrobiana nas superfícies das indústrias alimentícias.

## REFERÊNCIAS

ALLESEN-HOLM, M.; BARKEN, K.B.; YANG, L.; KLAUSEN, M.; WEBB, J.S.; KJELLEBERG, S.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 59, p.1114–1128, 2006.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cheese made in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.

APARNA, M.S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, p. 526–530, 2008.

ARAÚJO, E.A.; BERNARDES, P.C.; ANDRADE, N.J.; FERNANDES, P. E.; AS, J. P. N. Gibbs free energy of adhesion of *Bacillus cereus* isolated from dairy plants on different food processing surfaces evaluated by the hydrophobicity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2519–2525, 2009.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 70-75, 2008.

BAYLES, K.W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.721–726, 2007.

BIAZAR, E.; HEIDARI, M.; ASEFNEZHAD, A.; MONTAZERI, N. The relationship between cellular adhesion and surface roughness in polystyrene modified by microwave plasma radiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 631-639, 2011.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogen**, v. 4, p. e1000052, 2008.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends Microbiology**, v. 19, p. 449-55, 2011.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A.C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 73–78, 2004.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos**. DOU 11 de março de 1996.

BREMER, P. J.; MONK, I.; BUTLER, R. Inactivation of *Listeria monocytogenes/Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 321-325, 2002.

BREUKINK, E.; VAN HEUSDEN, H.E.; VOLLMERHAUS, P.J.; SWIEZEWSKA, E.; BRUNNER, L.; WALKER, S.; HECK, A.J.; DE KRUIJFF, B. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 19898–19903, 2003.

BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M.; PIARDB, J. C.; NAÏTALI, M.; BRIANDET, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, p. 167-178, 2015.

BRYERS, J.D; RATNER, B. D. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News-American Society for Microbiology**, v.70, p. 232-232, 2004.

CABALLERO GÓMEZ, N.; ABRIOUEL, H.; GRANDE, M. J.; PÉREZ PULIDO, R.; GÁLVEZ, A. Combined treatments of enterocin AS-48 with biocides to improve the inactivation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* planktonic and sessile cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 96-100, 2013.

CABO, M. L.; HERRERA, J. J.; CRESPO, M. D.; PASTORIZA, L. Comparison among the effectiveness of ozon, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CET4459 on polypropylene. **Food Control**, v. 20, p. 521-525, 2009.

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

CARVALHO, A. A. T.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 68-74, 2007.

CONWAY, B. A. D.; VENU, V.; SPEERT, D. P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 5678-5685, 2002.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5427-5433, 1999.

CRUZ, A. M. O. **Efeito da nisina sobre patógenos da mastite bovina**. 2009.96p. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola]. Universidade Federal de Viçosa.

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

DAT, N. M.; MANHA, L.D.; HAMANAKA, D.; HUNG, D. V.; TANAKA, F.; UCHINO, T. Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk, buttermilk, and butter serum solutions and its effect on bacterial adherence. **Food Control**, v. 42, p. 94-100, 2014.

DAVISON, W. M.; PITTS, B.; STEWART, P. S. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 2920-2927, 2010.

DEBEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P.S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4339-4344, 1994.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocin: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDIA, E.; GHIDINIA, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930–936, 2015.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p. 277–281, 2001.

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

DUEHOLM, M.S.; PETERSEN, S.V.; SONDERKAER, M.; LARSEN, P.; CHRISTIANSEN, G.; HEIN, K.L.; ENGHILD, J.J.; NIELSEN, J.L.; NIELSEN, K.L.; NIELSEN, P.H.; OTZEN, D.E. Functional amyloid in *Pseudomonas*. **Molecular Microbiology**, v.77, p. 1009–1020, 2010.

EL-ZINEY, M.; JAKOBSEN, M. Effectiveness of reuterin alone and in combination with nisin or other food contact surfaces sanitizers and cleaners for disinfection of stainless steel surfaces contaminated with *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 7, n. 3-4, p. 145-149, 2009.

ENNAHAR, S. SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. **FEMS Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 85-106, 2000.

FEY, P.D.; OLSON, M.E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future Microbiology**, v. 5, p. 917–933, 2011.

FLEMMING, H.C.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D.J.; The EPS matrix: the "house of biofilm cells". **Journal of Bacteriology**, v. 189, 7945–7947, 2007.

FLINT, S.H.; BROOKS, J.D.; BREMER, P.J. Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**, v.43, p. 235–242, 2000.

FOSTER, T. J.; HOOK, M. Surface proteins adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 6, p.484–488, 1998.

FOSTER, T.J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 456–470, 2009.

FREDHEIM, E. G. A.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J. E. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p.1172-1180, 2009.

GERTZ, S. ENGELMANN, S.; SCHMID, R.; OHLSEN, K.; HACKER, J.; HACKER, M. Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 558-566, 1999.

GIBSON, H.; TAYLOR, J.H; HALL, K.E, HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p. 41–48, 1999.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1367–1378, 2002.

HAMADI, F.; ASSERNE, F.; ELABED, S.; BENSOUDA, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, p. 104–108, 2014.

HEIJSTRA, B.D.; PICHLER, F.B.; LIANG, Q.; BLAZA, R.G.; TURNER, S.J. Extracellular DNA and Type IV pili mediate surface attachment by *Acidovorax temperans*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 95, p. 343–349, 2009.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GOTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 1083–1091, 1996.

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

HUSSAIN, M.; HERRMANN, M.; VON EIFF, C.; PERDREAU-REMGTON, F.; PETERS, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. **Infection and Immunity** v. 65, p. 519–524, 1997.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, p. 203–214, 2006.

IZANO, E.A.; AMARANTE, M.A.; KHER, W. B.; KAPLAN, J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 470–476, 2008.

JAHID, I.K.; HA, S.D. A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. **Food Science and Biotechnology**, v.21, p. 299-316, 2012.

KAISER, T. D. L.; PEREIRA, E.M.; DOS SANTOS, K. R.N.; MACIEL, E. L. N.; SCHUENCKA, R.P.; NUNESA, A.P.F. Show more modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, p. 235–239, 2013.

KIRKPATRICK, C.L.; VIOLLIER, P.H. Cell dispersal in biofilms: an extracellular DNA masks nature's strongest glue. **Molecular Microbiology**, v. 77, p.801–804, 2010.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with paracetic acid: a review. **Environmental International**, v. 30, p. 47-55, 2004.

KOREM, M.; GOV, Y.; ROSENBERG, M.. Global gene expression in *Staphylococcus* following exposure to alcohol. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, p. 74-84, 2010.

KROPEC, A; MAIRA-LITRAN, T; JEFFERSON, K.K; GROUT, M; CRAMTON, S.E; GÖTZ, F; GOLDMANN, D.A; PIER, G.B. Poly-*N*-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 6868-6876, 2005.

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M. T. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 988-993, 2008.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A..L. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 201–208, 2004.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 63-76, 2003.

LERICHE, V.; CHASSAING, D.; B, CARPENTIER. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 169–182, 1999.

LINDSAY, J. A.; FOSTER, S. J. Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. **Molecular and General Genetics**, v. 262, p. 323-331, 1999.

MACK, D; FISCHER, W; KROKOTSCH, A; LEOPOLD, K; HARTMENN, R; EGGE, H; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear  $\beta$ -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 175-183, 1996.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1-5, 2001.

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

MARTI, M.; TROTONDA, M. P.; TORMO-MAS, M. A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; CHEUNG, A. L.; LASA, I.; PENADES, J. R. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 55-64, 2010.

MARTÍNEZ, B.; OBESO, J. M.; RODRÍGUEZ, A.; GARCIA, P. Nisin-bacteriophage cross resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.122 p. 253–258, 2008.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p.327-356, 2003.

MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v. 25, p. 469-475, 2012.

MELCHIOR, M. B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W.; Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilm. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 141-149, 2007.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J. A.; FOSTER, T. J.; PENADES, J. R.; LASA, I. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 832-43, 2009.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. *In*: DOWNES, F. P.; ITO K (Eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: **American Public Health Association**, cap. 7, p. 66 – 67, 2001.

MULCAHY, M. E.; GEOGHEGAN, J. A.; MONK, I.R.; O'KEEFFE, K. M.; WALSH, E.J.; FOSTER, T.J.; MCLOUGHLIN, R.M. Nasal colonization by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. **Plos Pathogens**, v. 8, p. 1-14, 2012.

NEL, H.A.; BAUER, R.; WOLFAARDT, G.M.; DICKS, L.M.T. Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.53, p.191-196, 2002.

NOSTRO, A.; SCAFFARO, R.; GINESTRA, G.; D'ARRIGO, M.; BOTTA, L.; MARINO, A.; BISIGNANO, G. Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 87, p. 729-737, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology** , v. 322, 207–228, 2008.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial proprieties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 465-499, 2003.

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.

PIMENTEL-FILHO, N. J.; MARTINS, M. C. F.; NOGUEIRA, G.B.; MANTOVANI, H.C; VANETTI, M. C. D. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v.190, p. 1-8, 2014.

PIMENTEL-FILHO, N.J.; MANTOVANI, H. C.; DIEZ-GONZALEZ, F.; VANETTI, M. C. D. Inhibition of *Listeria* and *Staphylococcus aureus* by bovicin HC5 and nisin combination in milk. **Journal of Agricultural Science**, v. 5; p. 188-196, 2013.

RASSONI, E.M.M.; GAYLARDE, 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.

RICE, K. C; MANN, E. E ; ENDRES, J. L.; WEISS, E. C.; CASSAT, J. E.; SMELTZER, M. S.; BAYLES, K. W. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. **PNAS**, v. 104, p. 8113–8118, 2007.

RIVAS, L.; DYKES, G.A.; FEGAN, N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p.44–51, 2007.

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

ROMERO, D.; AGUILAR, C.; LOSICK, R; KOLTER, R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. **PNAS**, v. 107, p. 2230–2234, 2010.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C.; Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 3-16, 2002.

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

RUSSELL, A.D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p.750-763, 2003.

SAÁ-IBUSQUIZA, P.; HERRERA, J.J.R.; CABO, M.L. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 28, p. 418-425, 2011.

SADOWSKA, B.; WALENCKA, E.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; RÓŻALSKA, B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiology**, v. 55, p. 497–501, 2010.

SCHWARTZ, K.; SYED, A.K.; STEPHENSON, R.E.; RICKARD, A.H.; BOLES, B.R. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. **Plos Pathogens**, v. 8 p. e1002744, 2012.

SHALE, K.; LUES, J. F. R.; VENTER, P.; BUYS, E. M. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**, v. 22, p. 433–438, 2005.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SOUZA, E. L.; MEIRA, Q. G. S.; DE MEDEIROS BARBOSA, I.; ATHAYDE, A. J. A. A.; DA CONCEIÇÃO, M. L.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, p. 67–75, 2014.

SPOERING, A.L.; GILMORE, M.S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p.133–137, 2006.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HÁ, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p.572-585, 2013.

STAMFORD, M. L. T.; SILVA, M. G. C.; MOTA, A. R.; NETO, C. A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolado de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p.41-45, 2006.

SUDAGIDAN, M.; YEMENICIO, A. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1627-1633, 2012.

TEIXEIRA, P.; LOPEZ, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.J. Physico-chemical surface characterization of a bacteria population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, v. 22, p.247–251, 2005.

THOMAS, V.C.; HIROMASA, Y.; HARMS, N.; THURLOW, L.; TOMICH, J.; HANCOCK, L.E. Afratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 72, p. 1022–1036, 2009.

TOMASINI, A.; FRANÇOIS, P.; HOWDEN, B.P.; FECHTER, P.; ROMBY, P.; CALDERARI, I. The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p. 616-626, 2014.

TONGA,Z.; NI, L.C. LING, J. Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. **Peptides**, v. 60, p.32–40, 2014.

TOTÉ, K.; HOREMANS, T.; VANDEN BERGHE, D.; MAES, L.; COS, P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p. 3135–3142, 2010.

TRACHOO N. Biofilms and the food industry. **Science Technology**, v. 25, p. 807-815, 2003.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F.; The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clays Minerals**, v. 43, 474-477.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J.J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, v. 39, p. 8-16, 2014.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

VUONG, C.; SAENZ, H. L.; GOTZ, F.; OTTO M. Impact of the *agr* quorum sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infection Disease**, v. 182, p. 1688-1693, 2000.

VUONG, C; VOYICH, J.M; FISCHER, E.R; BRAUGHTON, K.R; WHITNEY, A.R; DELEO, F.R; OTTO, M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 269-275, 2004.

WANG, R.; KHAN, B. A.; CHEUNG, G. Y.; BACH, T. H.; JAMESON-LEE, M.; KONG, K. F.; QUECK, S. Y.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 238-48, 2011.

WANG, R.; NEOH, K.G.; SHI, Z.; KANG, E.T.; TAMBYAH, P. A.; CHIONG, E. Inhibition of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109 p. 336-345, 2012.

WHITCHURCH, C.B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P.C.; MATTICK, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, p.1487, 2002.

YARWOOD, J. M.; BARTELS, D. J.; VOLPER, E. M.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 1838-50, 2004.

YAZDANI, R.; OSHAGHI, M.; HAVAYI, A.; SALEHI, R.; SADEGHIZADEH, M.; FOROOHESH, H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from wound infections. **Iranian Journal of Public Health**, v. 35, p. 25-28, 2006.

ZOTTOLA, E. A; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.