



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA

**ADESÃO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM SUPERFÍCIES
DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS**

Londrina
2006



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA

**ADESÃO DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* EM SUPERFÍCIES
DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários para obtenção de título de Doutor.

Londrina
2006

KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA

**ADESÃO DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* EM SUPERFÍCIES
DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Terezinha Inês Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá - Pr

Prof. Dr. Nélio José de Andrade
Universidade Federal de Viçosa - MG

Profa. Dra. Regina Lúcia dos Santos
Universidade Estadual de Londrina - Pr

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina - Pr

Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - Pr

Londrina 10, março de 2006.

DEDICATÓRIA

À Minha Mãe,

Que sempre me acompanhou e me apoiou e a quem devo o percurso da minha vida, estou grata pelo amor, confiança, estímulo e coragem que tão oportunamente me soube transmitir.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que me concedeu a vida, e saúde durante a execução deste trabalho e força nos momentos difíceis e que sempre me abençoou com as pessoas certas nas horas em que mais precisei.

A Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pela orientação e profissionalismo, e pela importante contribuição para o meu crescimento científico desde a graduação.

Aos meus Professores e amigos do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, pela excelência dos conhecimentos transmitidos e pelo incentivo e apoio na minha formação acadêmica e vida profissional.

À Doutora Rosário Oliveira, minha orientadora em Portugal, agradeço por ter me recebido em seu laboratório, bem como pela correção dos artigos.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (TAM) da Universidade Estadual de Londrina, pelo apoio à pesquisa científica.

Ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

À CAPES, pelo apoio financeiro que foi de fundamental importância para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório da Universidade do Minho pela agradável convivência, em especial à Mariana, por sua contribuição no início deste trabalho.

À Fátima Jacinto, pela sua generosidade e a minha querida amiga Salomé, pela grande amizade que se construiu e se consolidou.

À Dra. Terezinha Inês Estivalet Svidzinski pela amizade e disponibilidade, pelo apoio científico e pelas preciosas idéias que muito me auxiliaram.

A Sandra Rezende, secretária do TAM, que, com profissionalismo e competência, se preocupa em facilitar o andamento do trabalho do pesquisador.

A toda minha família e aos meus pais Valdomiro e Lourdes pelo apoio incondicional, vocês foram meu “porto seguro” nos momentos mais difíceis, e também compartilharam comigo uns dos momentos mais felizes da minha vida.

À minha querida princesinha Emanuele, que só me trouxe alegria e ao Cleves pelo apoio e compreensão.

A todos os amigos que, com palavras e gestos de incentivo e carinho, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os biofilmes são estruturas altamente organizadas nas quais microrganismos crescem e sobrevivem a ambientes hostis. São definidos como complexos ecossistemas microbianos embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) aderidos a uma superfície. Biofilmes apresentam uma maior resistência aos sanitizantes que as células livres e quando em superfícies de processamento de alimentos podem trazer problemas relacionados à contaminação cruzada, contaminação pós-processamento e corrosão de equipamentos. A compreensão dos fatores e processos biológicos envolvidos no estabelecimento e desenvolvimento dos biofilmes é de fundamental importância. Os mecanismos que governam a adesão dependem da natureza da superfície de contato e das propriedades superficiais dos microrganismos. O objetivo deste trabalho foi estudar os fatores determinantes da adesão de quatro isolados diferentes de *Salmonella* Enteritidis, um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* e um isolado de *Serratia marcescens* em diferentes materiais utilizados no processamento dos alimentos. As características das cepas estudadas foram correlacionadas com as taxas de adesão e hidrofobicidade. O estudo de adesão foi realizado em aço 304, polietileno, polipropileno e granito, materiais normalmente utilizados em superfícies de processamento de alimentos. A medida do ângulo de contato foi empregada para determinar a hidrofobicidade e a tensão superficial das superfícies de contato e dos microrganismos. A técnica espectroscópica de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e a análise da rugosidade foram utilizadas para análise superficial das cepas estudadas e caracterização das superfícies de contato testadas, respectivamente. Todas as cepas estudadas mostraram valores positivos para a hidrofobicidade e foram consideradas hidrofílicas. Os resultados encontrados com a XPS sustentam a similaridade dos valores de hidrofobicidade obtidos pelo ângulo de contato. *P. aeruginosa* foi a cepa mais hidrofóbica e apresentava a maior quantidade de N/C. O caráter hidrofílico da *S. marcescens* foi relacionado com a grande quantidade de O/C. As diferentes cepas de *Salmonella* mostraram similaridade na composição da parede celular e nas propriedades físico-químicas das superfícies. A adesão das diferentes cepas de *Salmonella* as diversas superfícies foram estatisticamente diferentes. A fonte de isolamento das *Salmonella* spp. não parece afetar a habilidade de adesão. Contudo, *S. Enteritidis* MUSC apresentou maior capacidade de adesão às superfícies estudadas ($p < 0.05$). A facilidade de interação desse isolado de *Salmonella* as superfícies de contato poderia ser explicado por sua grande capacidade de aceitar elétrons. Todas as superfícies apresentaram caráter hidrofóbico e não foi possível estabelecer nenhuma correlação na capacidade de doar elétrons e receber elétrons sobre a interação das superfícies. Não foi encontrada uma relação entre rugosidade dos materiais e adesão bacteriana. O polietileno apresentou os maiores valores de rugosidade média, no entanto, foi o material no qual ocorreu a menor adesão. Considerando todas as tentativas de explicação baseadas nas propriedades físico-químicas das bactérias e das superfícies, não é possível estabelecer nenhuma correlação direta e deduzir uma hipótese de um modelo racional de adesão.

Palavras chaves: Adesão. *Salmonella* Enteritidis. Superfícies. Hidrofobicidade. Ângulo de contato. XPS.

ABSTRACT

Biofilms are structures highly organized in which microorganisms grow and therefore can survive to hostile environments. They are defined as a complex community of microorganisms usually encased in an extracellular matrix of polymeric substances (EPS) attached to a surface. Cells embedded in biofilm are more resistant to sanitizers than free cells. Biofilms in food processing surfaces can cause problems such as cross contamination, product contamination and equipment corrosion. A greater understanding of biofilms formation is important for food quality and safety. The mechanism governing microbial adhesion to surfaces depends on the nature of the contact surface and the bacterial surface properties. The aim of this study was to investigate the factors that are involved in the adhesion of four *Salmonella* Enteritidis isolates, one *Pseudomonas aeruginosa* isolate and one *Serratia marcescens* isolate to different materials (steel 304, polyethylene, polypropylene and granite) used as cover surfaces or as other utensils in kitchens. The bacterial surface properties were correlated with taxes of adhesion and hidrophobicity, which was, evaluated through contact angle measurements using the sessile drop method. The X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and roughness were used to analyze the strains surface characteristics and the inert surfaces studied, respectively. All strains analyzed showed positive values of hidrophobicity and were considered hydrophilic. The XPS results corroborated with the similarity of the hidrophobicity values obtained. *P. aeruginosa* was the most hydrophobic strain and had the highest amount of N/C. The hydrophilic characteristic observed in *S. marceceus* was related to the high surface quantity of O/C. All *Salmonella* strains analyzed showed similar wall cellular composition and the same physical chemical surfaces properties. Statically, the extent of adhesion of the different strains to the materials assayed was different ($p < 0.05$). The source of *Salmonella* spp. isolates does not seem to affect the ability of adhesion. However, *S. Enteritidis* MUSC showed the highest capacity of adhesion to all surfaces studied ($p < 0.05$) that could be explain by its capacity to accept electrons. All the surfaces had hydrophobic character; at least it is not possible to establish any correlation between the electron donor and electron acceptor capabilities of the interacting surfaces. No correlation between inert surface roughness and bacterial adhesion was found. Polyethylene was the roughest material but it was the material displaying less extent of bacterial colonization. Considering all the tentative explanations based on physico-chemical properties of bacterial cells and surfaces, it is not possible to establish any direct correlation to elicit the hypothesis of a reasonable model of adhesion.

Keywords: Adhesion. *Salmonella* Enteritidis. Surfaces. Hydrophobicity. Contact angle. XPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração processo formação de um biofilme	16
Figura 2 - Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. Nesta figura, γ_S e γ_{LV} são a energia de superfície do sólido e a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, respectivamente; γ_{SL} é a energia da interface sólido – líquido.	28
Figura 3 - Irradiação das amostras por feixe de raios X	32
Figura 4 - Esquema de um aparelho de XPS.....	33
Figura 5 - Rugosidade Média (R_a).....	36
Figura 6 - Média da raiz quadrada dos desvios do perfil (R_q)	36
Figura 7 - R_z Média dos dez pontos mais irregulares	36
Figura 8 - Estrutura química do Polietileno	40
Figura 9 - Estrutura química do Polipropileno	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS DE MICRORGANISMOS ADERIMOS	13
3.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME	14
3.3 COMPOSIÇÃO DO BIOFILME.....	16
3.4 CONDICIONAMENTO DA SUPERFÍCIE.....	17
3.5 ADESÃO	18
3.5.1 Adesão reversível.....	19
3.5.2 Adesão irreversível.....	19
3.6 PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR POLIMÉRICA	20
3.7 CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E DESPRENDIMENTO DO BIOFILME	21
3.8 ASPÉCTOS TERMODINÂMICOS DA ADESÃO INICIAL	22
3.8.1 Teoria DLVO	23
3.8.2 Forças de Curto Alcance	25
3.8.3 Teoria XDLVO	25
3.9 HIDROFOBICIDADE	27
3.9.1 Medida do Ângulo de Contato	28
3.10 TÉCNICA ESPECTROSCÓPIVA DE FOTOELETRONS EXCITADOS POR RAIOS X (X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY) – XPS.....	31
3.11 RUGOSIDADE DOS MATERIAIS	34
3.12 SUPERFÍCIES ESTUDADAS	37
3.12.1 Aço	37
3.12.2 Granito.....	39
3.12.3 Polietileno.....	39
3.12.4 Polipropileno.....	41
REFERÊNCIAS	43

APÊNDICE	52
ANEXOS	55
ANEXO 1: ARTIGO 1 Biofilmes Microbianos e resistência aos sanitizantes: uma revisão	57
ANEXO2: ARTIGO 2 Factors involved in attachment of <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Serratia marcescens</i> to stainless steel	74
ANEXO 3: ARTIGO 3 Adhesion of <i>Salmonella</i> Enteritidis to materials used in kitchen surfaces	92

1 INTRODUÇÃO

A salmonelose humana ocorre, principalmente, devido à ingestão de alimentos ou água contaminados. Em vários países, *Salmonella* Enteritidis é o principal sorovar responsável pela doença e nos últimos anos, em todo o mundo, observou-se um aumento de salmonelose relacionada com o consumo de carne de frangos, ovos e derivados (SOCKETT, 1995).

No Estado do Paraná, a partir de 1995, a salmonelose tem sido a principal enfermidade transmitida por alimentos. Em 1997 e 1998, 52,3% e 56,1% dos surtos, respectivamente, foram causados por *Salmonella* spp e o principal alimento envolvido foi a maionese de batata. Entretanto, conforme dados fornecidos pelo Laboratório Geral do Estado do Paraná (LACEN), de 1999 a junho de 2001, o bolo recheado foi responsável por 10 (41,6%) dos 24 surtos ocorridos neste Estado. Nesse mesmo período, os alimentos nos quais o ovo foi utilizado em alguma fase do preparo foram responsáveis por 20 surtos (83,3%). Esses dados indicam que a contaminação desses alimentos por *Salmonella* spp pode estar ocorrendo pela utilização de ovo contaminado ou por manipulação inadequada e, conseqüentemente, contaminação cruzada (ZHAO et al., 1998; CHEN, et al. 2001).

Vários estudos mostram que a ocorrência de *Salmonella* spp em carcaças de frango pode variar de 0,024 a 85,0% (GASPARETTO, 2000; CARRAMIÑANA et al., 1997, RUSUL et al., 1996). Este fato sugere a possibilidade da carcaça de frango ser também uma fonte importante de contaminação de utensílios e superfícies de cozinha e reforça a hipótese da manipulação inadequada levar à contaminação cruzada, principalmente, de alimentos muito manipulados.

Vários microrganismos podem aderir e formar biofilme nos utensílios e nas superfícies de cozinha, tornando difícil a sua remoção durante a limpeza. Conseqüentemente, serve como fonte de contaminação de alimentos e transmissão de doenças (JOSEPH et al., 2001; BONAFONTE et al., 2000; HOOD; ZOTTOLA, 1997a).

O aumento da resistência a agentes antibacterianos e sanificantes das células que formam o biofilme tem sido observada (JOSEPH et al., 2001). Assim sendo, a compreensão dos fatores e processos biológicos envolvidos no estabelecimento e desenvolvimento da aderência dos microrganismos, que

constituem o biofilme, são de fundamental importância, já que, pode conter microrganismos que causam problemas econômicos na indústria de alimentos ou que significam risco à saúde (AUSTIN, et al., 1998)

Salmonella spp. é capaz de formar biofilme sobre diversos tipos de superfícies (AUSTIN et al., 1998.; BONAFONTE et al., 2000) e esse fato é, provavelmente, um fator importante de disseminação de *Salmonella* spp. nos locais de preparo de alimentos (WOODWARD, et al., 2000).

Hidrofobicidade da superfície bacteriana, cargas, densidade celular e exopolissacarídeos têm sido citados como importantes fatores de adesão a superfícies. Outras estruturas celulares como fímbrias ou pili, flagelo, lipopolissacarídeo, cápsulas ou "*slime layers*" têm sido também relacionado (DICKSON; KOOHMARAIE, 1989; AUSTIN, et al., 1998; WOODWARD, et al., 2000).

Face a estas considerações, e levando-se em conta que a salmonelose é a doença de origem alimentar mais freqüente no Paraná, este trabalho estudou os fatores determinantes da adesão e colonização de *Salmonella* Enteritidis em diferentes materiais utilizados em bancadas e utensílios de cozinha.

2 OBJETIVOS

- Verificar a capacidade de adesão de isolados de *Salmonella* spp em diferentes materiais utilizados na fabricação de utensílios e bancadas de cozinha.
- Correlacionar as características das cepas isoladas com as taxas de adesão e hidrofobicidade.
- Comparar as características de adesão de *Salmonella* spp. com *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*, que são bactérias não enteropatogênicas.
- Realizar a caracterização físico-química da superfície celular e das superfícies de aderência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS DE MICRORGANISMOS ADERIDOS

Um dos primeiros trabalhos sobre aderência bacteriana a superfícies foi descrito Zobell, em 1943, que descreveu a adesão de bactérias marinhas em superfícies submersas. Nesse estudo foi observado que a adesão bacteriana era tempo-dependente e que a quantidade de lodo aumentava com o tempo de contato à superfície (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Desde então, adesão bacteriana no ambiente marinho foi exaustivamente estudada.

Células planctônicas são bactérias livres e vivas com seu metabolismo normal, e que não estão aderidas a uma superfície ou entre elas. Quando as células planctônicas se associam com uma superfície, a aderência é um termo utilizado. O termo adsorção também descreve o evento inicial quando uma célula bacteriana se associa a uma superfície, denominada de substrato (HOOD; ZOTTOLA, 1995; WONG et al., 2002).

Biofilme é um complexo ecossistema microbiano embebido em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), aderidas a uma superfície. Biofilme não está relacionado somente com a presença dos microrganismos, mas também com todo o material extracelular produzido e o material onde está aderido. Considerando que a bactéria pode aderir a uma superfície em minutos, em geral é assumido que um verdadeiro biofilme leva horas ou dias para se desenvolver (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

Os biofilmes podem se romper e permitir que mais células se prendam em superfícies e se desenvolvam. Teoricamente, o fato de que biofilmes podem desalojar de uma superfície é um motivo de preocupação (HOOD; ZOTTOLA, 1995; MORTON et al., 1998; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002; VIDELA, 2002). Algumas moléculas sinalizadoras, denominadas *quorum-sensing*, produzidas por células bacterianas em um biofilme, permitem que as células se comuniquem umas com as outras, para que elas cresçam e sobrevivam a ambientes hostis ou se desprendam para formar novos biofilmes.

Do ponto de vista do interesse do homem, os biofilmes podem ser neutros, benéficos ou prejudiciais. Neste último caso, os biofilmes passam a ser referidos industrialmente como sujamento biológico ou “biofouling” (HOOD; ZOTTOLA, 1995; PEREIRA, 2001).

Os biofilmes benéficos são importantes no ecossistema e nos ciclos de nutrientes (ciclo do carbono, enxofre, fósforo, etc.). Este potencial natural dos biofilmes foi e continua a ser explorado pelo homem em inúmeros processos biológicos. Na biotecnologia ambiental, especificamente no tratamento de águas residuais, já que os biofilmes podem remover os poluentes orgânicos e inorgânicos presentes nos efluentes (PEREIRA, 2001).

A formação de biofilme foi estudada por diferentes setores, mostrando o impacto negativo desse fenômeno (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Entre os problemas já estudados podem ser citados a formação de biofilmes em cânulas utilizadas para administração de dietas especiais e medicamentos, o que pode contribuir para a contaminação de pacientes imunocomprometidos (DAUTLE; WILKINSON.; GAUDERER, 2003), adesão em lentes de contato (BRUINSMA et al., 2001), adesão de microrganismos na indústria de alimentos e sua resistência aos sanitizantes (SINDE; CARBALLO, 2000; GIBSON et al., 1999) e adesão em superfícies de cozinhas o que leva a contaminação cruzada (HOOD; ZOTTOLA, 1997a; WOODWARD et al., 2000; JOSEPH et al., 2001)

3.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME

A formação de biofilme é um processo dinâmico. Os modelos atuais, baseados em grande parte no estudo com *Pseudomonas* spp., descrevem a formação de biofilme como um processo linear, que começa quando células bacterianas planctônicas prendem-se a uma superfície. Essa adesão é seguida de multiplicação do microrganismo, desenvolvimento da estrutura do biofilme e dispersão de células bacterianas na superfície. Essas várias fases de interações microbianas com a superfície parecem requerer a produção de substância extracelular polimérica (EPS) que ajuda na adesão inicial e na manutenção da

estrutura do biofilme (HOOD; ZOTTOLA, 1995; AZEREDO, 1998; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002; HAYASHI, et al., 2001).

A adesão é a primeira etapa no complexo processo de formação de um biofilme. O mecanismo mais aceito de adesão de bactéria em superfícies sólidas apresenta duas etapas, a adesão reversível e a adesão irreversível (MARSHALL 1971 apud HOOD; ZOTTOLA, 1995). O modelo proposto por Busscher e Weerkamp (1987) considera no processo a distância entre a bactéria e a superfície de adesão, que ocorrem em três etapas. Em ambos os modelos, o passo final depende da habilidade do microrganismo metabolizar e produzir material adesivo. A formação do biofilme descrito por Hamilton e Characklis apud Morton et al. (1998) envolve quatro etapas para o desenvolvimento do biofilme. Primeiramente ocorre o transporte de moléculas orgânicas e células para a superfície, em seguida a adsorção dessas moléculas orgânicas para formar um "condicionamento da superfície", e somente na terceira etapa ocorrerá à adsorção de células para a superfície condicionada e o crescimento de células com a síntese de (EPS). À medida que vem sendo estudado o desenvolvimento do biofilme, novas etapas vem sendo descritas no processo de formação.

Levando em consideração os modelos descritos na literatura a formação do Biofilme ocorre nas seguintes etapas (Figura 1): (1) Transporte de moléculas orgânicas para a superfície e adsorção para a formação do filme condicionador; (2) Transporte de microrganismos e outras partículas para a superfície condicionada; (3) Adesão reversível a superfície; (4) Adesão entre os microrganismos aderidos; (5) Adesão irreversível das células, com produção de polímeros extracelulares (EPS); (6) Multiplicação das células e crescimento do Biofilme; (7) Transporte de subprodutos do biofilme para o exterior; (8) Desprendimento do biofilme (HOOD; ZOTOLLA, 1995; KUMAR; ANAND, 1998; MORTON et al., 1998; BOS et al., 1999; BRUINSMA et al., 2001; Den AANTREKKER et al., 2003)

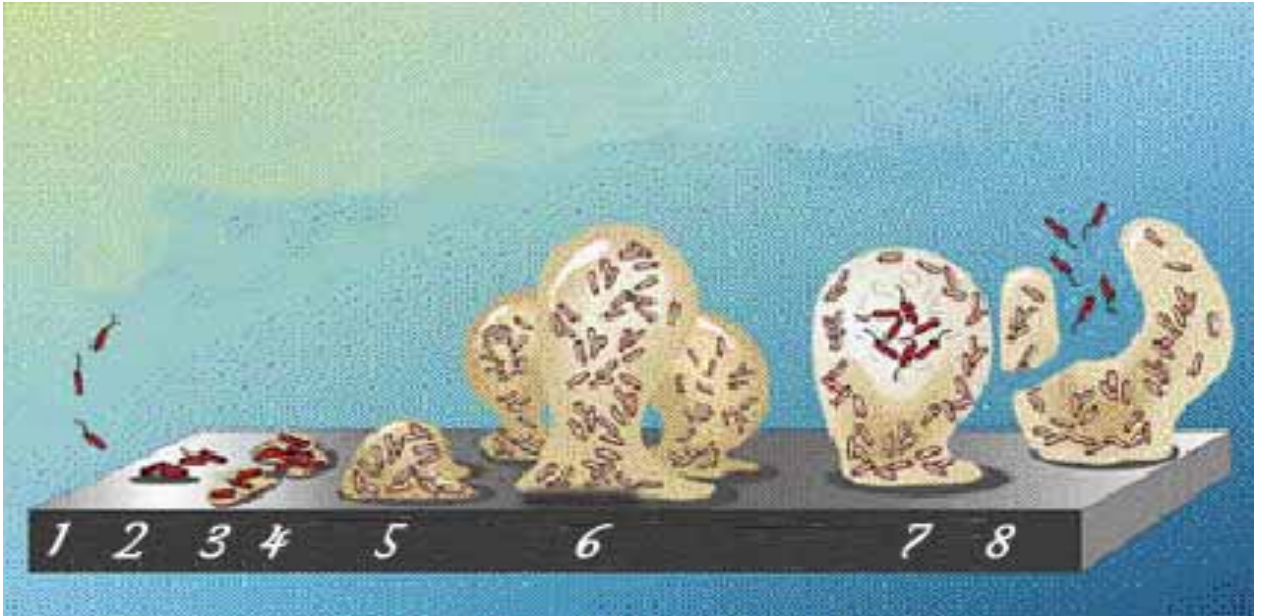


Figura 1 – Ilustração processo formação de um biofilme

3.3 COMPOSIÇÃO DO BIOFILME

O biofilme é composto por aproximadamente 97% de água. Esta porcentagem varia dependendo das características ambientais onde o biofilme se encontra. Segundo Sutherland (2001), além da água e das células microbianas, a matriz do biofilme é composta de um complexo de polímeros, nutrientes absorvidos e metabólitos, produtos de lise celular e partículas de materiais do meio onde se encontra (Tabela 1).

Estudos recentes mostraram que os biofilmes na natureza são heterogêneos. Os microrganismos presentes em podem exibir diferentes propriedades fisiológicas e metabólicas. Bactérias anaeróbias e aeróbias podem ser isoladas do mesmo biofilme. Por exemplo, *P. aeruginosa* tende a ser encontrada no interior do biofilme e *V. parahaemolyticus* escolhe estar perto da interface do biofilme-líquido. A interdependência metabólica pode acontecer entre espécies presentes no Biofilme (STEELE; GODDARD; BEECH, 1994; HOOD; ZOTTOLA, 1995; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002). E muitos patógenos humanos potenciais como *Listeria pneumophila*, *Cryptosporidium* spp, *Mycobacterium* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp, Rotavirus, Giardia, micoplasmas e

protozoários podem se associar e formar biofilmes (MORTON et al., 1998; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

Tabela 1 – Composição dos Biofilmes

Componentes	% na matriz
Água	Acima de 97%
Células microbianas	2-5% (várias espécies)
Polissacarídeos (homo e hetero-polissacarídeos)	1-2% (neutro e polianiónico)
Proteínas (extracelulares e resultante de lise)	<1-2% (várias, incluindo enzimas)
DNA e RNA	< 1-2% (de lise de células)
Íons	? (ligados ou livres)

Fonte: Sutherland, (2001).

3.4 CONDICIONAMENTO DA SUPERFÍCIE

O primeiro estágio na formação do biofilme está relacionado com o meio onde o microrganismo se encontra, pois serão componentes deste meio que irão adsorver a superfície e formar o filme condicionador. Por exemplo, o filme condicionador em laticínios será o leite, em abatedouros proteínas e gorduras da carne, nos dentes a saliva e será em sistema de abastecimento de água a própria água.

O filme condicionador provavelmente altera as propriedades físico-químicas da superfície. Barnes et al. (1999) estudaram a adesão de *Listeria*

monocytogenes e *Staphylococcus aureus* no aço condicionado com leite e com as proteínas do leite e observaram uma menor adesão no aço condicionado com leite comparado ao aço condicionado com água. Resultados similares foram encontrados por Helke et al. (1993) e Speers e Gilmour (1985). Cunliffe et al. (1999) estudaram os efeitos físico-químicos das superfícies condicionadas com diferentes substâncias e encontraram uma menor adesão quando a superfície foi condicionada com grupamentos hidrofílicos. Flint; (2000) também encontraram uma menor adesão quando trataram uma superfície com soluções alcalinas. Assim, a aderência microbiana poderá ser alterada através das alterações das cargas de superfície pelo uso de diferentes soluções, como os sanitizantes.

Normalmente, moléculas do meio são responsáveis pelo condicionamento, contudo certos microrganismos também são capazes de condicionar a superfície. Sasahara e Zottola (1993) observaram que *Listeria monocytogenes* mostrou aderência ao vidro significativamente maior quando crescia juntamente com *Pseudomonas fragi*. Os autores concluíram que *P. fragi* pode colonizar primeiro e a EPS produzida por este microrganismo ser a responsável pelo aumento da adesão de *L. monocytogenes*.

3.5 ADESÃO

O segundo passo na formação do Biofilme é a aderência do microrganismo à superfície condicionada, fenômeno que ocorre naturalmente. O processo da adesão pode ser ativo ou passivo e depende da motilidade bacteriana ou do transporte das células planctônicas por gravidade, difusão ou forças dinâmicas do fluido onde se encontram (KUMAR; ANAND, 1998).

Os mecanismos envolvidos na adesão inicial são dependentes não só das propriedades microbiológicas (EPS e estruturas celulares) e físico-químicos da superfície bacteriana, mas também da composição da superfície de adesão, como a natureza eletroquímica e hidrofobicidade relativa, da rugosidade e do filme condicionador. Para acontecer, deve haver forças atraentes entre a célula e a superfície. Essas forças de atração devem ser grandes o suficiente para superar qualquer força repulsiva. Forças de longo alcance e interações de alcance limitado

podem ter um papel significativa na adesão (HOOD; ZOTTOLA, 1995; HENRIQUES; AZEREDO; OLIVEIRA, 2002), que pode ser dividida em dois passos: adesão reversível e adesão irreversível (MARSHALL et al., 1971 apud HOOD; ZOTTOLA, 1997a; BONNAFONTE et al., 2000; LIU et al., 2004).

3.5.1 Adesão Reversível

Inicialmente, o transporte dos microrganismos até a superfície pode ser por movimentos *Brownianos* ou, quando em um meio líquido pode ser pelo próprio movimento do meio.

Durante este estágio várias forças estão envolvidas. As forças de longo alcance como forças de van der Waals e forças da dupla camada elétrica e forças de curto alcance como a interação hidrofóbica. As interações hidrofóbicas apesar de serem consideradas de curto alcance, podem em determinados casos, ocorrer até 80 nm da superfície e apresentar energias potenciais de interação duas vezes maiores do que a interação de van der Waals (PASHLEY; ISRAELACHVILI, 1984).

Adesão é reversível quando a bactéria ainda mostra movimentos *Brownianos* que podem removê-las por forças exercidas pelo líquido. A adesão começa a tornar-se irreversível quando deixa de ser removida facilmente da superfície e começa a produção de EPS.

3.5.2 Adesão Irreversível

A adesão irreversível inicia com a produção de EPS, que é tempo-dependente (HOOD; ZOTTOLA, 1997; BONAFONTE et al., 2000; BRUINSMA et al., 2001). Para ocorrer, o microrganismo deve ultrapassar as forças repulsivas, utilizando apêndices especiais como flagelo, fimbrias, pili e exopolissacarídeos. Na adesão irreversível várias forças de curto alcance estão envolvidas como interações

dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, iônicas e covalentes e interações hidrofóbicas (KUMAR; ANAND, 1998).

A motilidade ajuda na colonização dos microrganismos Gram-negativos, porém não é uma condição prévia para formação do biofilme, pois várias bactérias que não apresentam motilidade como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, e *Mycobacteria* formam biofilmes rapidamente. Woodward et al. (2000) estudaram o envolvimento da fímbria SEF14 e SEF17 na adesão de *Salmonella* Enteritidis e encontraram que cepas mutantes, sem fimbrias, a adesão foi reduzida em 90% em relação as bactérias que possuíam fimbrias. Na adesão de *Staphylococcus epidermidis*, proteínas e adesinas polissacarídicas foram relacionadas à aderência (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002), e Morton et al. (1998) concluíram que a adesão em ambientes naturais e industriais é mediada por EPS, produzidos pelas próprias células.

3.6 PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR POLIMÉRICA

A EPS é constituída de polissacarídeos, ácidos nucléicos e proteínas que servem de união entre as microcolônias que formam o biofilme. EPS é também denominada de matriz extracelular, “substâncias polímeras“, “polissacarídeos extracelulares” e “substância extracelular polimérica”.

O termo glicocálice, cápsula ou camada limosa em muitos casos também se referem a EPS. A EPS produzida pelos microrganismos é importante na adesão inicial do microrganismo, bem como em sua permanência, por protegerem as células da desidratação e auxiliarem na captura de nutrientes. A EPS conserva e concentra enzimas digestivas liberadas pelas bactérias, aumentando assim a eficiência metabólica das células. Constitui uma barreira física e protege da ação de agentes antibacterianos (HOOD; ZOTTOLA, 1997b; MORTON et al., 1998; BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2004).

A composição química da EPS é específica de cada cepa. O polímero polissacarídeo alginato, produzido por *P. aeruginosa*, é o componente melhor estudado de biofilme e parece ter um papel importante na estrutura do biofilme, determinando a complexidade estrutural em forma de cogumelo

(HENTTZER et al. 2001). Em biofilmes orais, as bactérias são capazes de sintetizar dextranos e levanos utilizando a sacarose da alimentação como substrato (SUTHERLAND, 2001). *V. cholerae* produz EPS rica em galactose e glicose. A composição da EPS excretada também pode variar conforme varia a composição do meio.

Ainda não ficou estabelecido se os ácidos nucléicos e as proteínas encontradas na EPS têm um papel estrutural ou somente são resíduos da lise celular. O DNA extracelular parece ter importância na estrutura, pois quando os biofilmes jovens (<60 h) são expostos a DNase ocorre o rompimento de microcolônias. A utilização de enzimas poderia ser útil na limpeza de superfícies pela possibilidade de remoção ou desestabilização dos biofilmes devido à alteração das propriedades da EPS (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002).

Embora os polissacarídeos sejam os componentes mais estudados e caracterizados da EPS, os dados disponíveis sugerem que a EPS produzida por diferentes espécies microbianas em condições de crescimento diversas, apresenta grande diversidade em relação à sua constituição. A dificuldade encontrada na caracterização química da EPS se deve a problemas encontrados durante a separação e extração da EPS de células bacterianas e à complexidade da análise de polissacarídeos altamente ramificados e com uma grande variedade de acoplamentos (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002).

3.7 CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E DESPRENDIMENTO DO BIOFILME

Após a adesão irreversível, as células crescem e se multiplicam utilizando os nutrientes presentes no filme condicionador e no fluido que as envolve. Durante este período as células também produzem EPS, a qual auxilia na ancoragem das células a superfície. Estudos atuais sugerem que EPS de alto peso molecular não agem diretamente como adesina. Outros fatores, possivelmente polissacarídeos de baixo peso molecular, medeiam o processo de colonização inicial seguido da ação de EPS de peso molecular mais alto (HOOD; ZOTTOLA, 1995; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

O desenvolvimento do biofilme acontece através de vários mecanismos, podendo ocorrer pela redistribuição de células aderidas na superfície e pela motilidade dos microrganismos na própria superfície. Fatores ambientais, como troca do substrato do meio, também alteram o desenvolvimento do biofilme. Applegate e Bryers (1991) observaram que quando havia baixa disponibilidade de oxigênio e carbono ocorria mudança no biofilme e a troca de substrato fazia com que as células se desprendessem da superfície. O crescimento do biofilme resulta da divisão dos microrganismos, as células filhas se espalham formando um agrupamento de células de maneira semelhante à formação de colônia em placas de ágar. Esse tipo de crescimento foi monitorado microscopicamente e foi possível medir a expansão radial de microcolônias de *Mycobacterium fortuitum* em uma superfície de silicone (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002).

Em uma superfície com grande quantidade de bactérias densamente condensadas, o crescimento pode ser prejudicado, com posterior morte celular, devido à incapacidade de obtenção de nutrientes e ou pelo acúmulo de metabólitos tóxicos liberados. Entretanto, isso não acontece, pois os biofilmes são estruturas altamente organizadas. As células bacterianas produzem moléculas sinalizadoras, também denominadas *quorum-sensing*, que permitem a comunicação entre elas, e dessa forma possibilitando, que as bactérias cresçam e sobrevivam em ambientes hostis.

Os processos de rompimento do biofilme acontecem a qualquer hora durante o desenvolvimento, resultando na liberação e ressuspensão dos microrganismos do biofilme para a fase planctônica (livre) do sistema (MORTON et al., 1998; KUSUMANINGRUM et al., 2003) e posterior disseminação do biofilme.

3.8 ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA ADESÃO INICIAL

Os pesquisadores têm se esforçado para descrever o processo de adesão em termos de princípios físicos químicos e o conflito começa. Em algumas reportagens, o processo de adesão tem sido descrito em termos de teoria de colóides.

O contato entre um microrganismo e uma superfície em solução aquosa só pode realizar se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, as interfaces bactéria/líquido (bl) e superfície de adesão/líquido (sl) terão que ser substituída pela interface bactéria/superfície de adesão (b/s). Segundo o modelo termodinâmico, a energia livre permutada neste fenômeno tende a ser minimizada e, portanto a adesão só poderá ocorrer se o processo conduzir a uma diminuição da energia livre global. Neste modelo, não são consideradas as interações eletrostáticas e as interações específicas mediadas por exopolímeros ou apêndices extracelulares.

A energia livre ΔG_{adesao} permutada na substituição das interfaces é definida pela equação de *Dupre* (ABSOLOM et al., 1983).

$$\Delta G_{adesao} = \gamma_{bs} + \gamma_{bl} + \gamma_{sl}$$

Nesta equação γ_{bs} corresponde a tensão superficial interfacial bactéria/suporte, γ_{bl} corresponde a tensão superficial bactéria/líquido e γ_{sl} corresponde a tensão interfacial suporte/líquido (HOOD; ZOTTOLA, 1995; AZEREDO, 1998). A tensão interfacial pode ser determinada recorrendo a vários métodos analíticos, sendo a medição do ângulo de contato a técnica mais utilizada.

3.8.1 Teoria DLVO (Derjaguin e Landau (1941), Verwey e Overbeek (1948))

A adesão de microrganismos a superfícies pode ser definida como a energia envolvida nessa adesão. Portanto, a força de adesão pode ser quantificada como o trabalho necessário para remover a célula e repô-la no seu estado original (MARSHALL, 1984).

Uma vez que a maioria das bactérias não excede 2,0 μm de comprimento, possui densidade pouco superior à da água e carga global negativa. Portanto, as bactérias podem ser consideradas partículas coloidais vivas e conseqüentemente, a adesão a superfícies tem sido interpretada de acordo com a teoria DLVO, que explica a estabilidade de colóides liofóbicos.

A Teoria DLVO, desenvolvida por Derjaguin e Landau (1941, apud AZEREDO, 1998) Verwey e Overbeek (1948, apud AZEREDO, 1998), explica a

adesão do microrganismo com base na interação entre partículas coloidais e despreza todos os aspectos microbiológicos.

Segundo a teoria DLVO, a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre forças atrativas de van der Waals e as forças da dupla camada elétrica. Uma vez que a maioria das superfícies adquire carga negativa quando em solução, as forças da dupla camada elétrica apresentam geralmente um caráter repulsivo.

Os três tipos de forças genericamente designados por forças de van der Waals são: (1) Dispersão de *London*, que ocorre quando dois átomos se aproximam e se atraem devido a dipolos instantâneos induzidos (alteração relativa da posição do elétron em relação ao nêutron); (2) interações de *Debye*, que se manifestam quando uma molécula que possui um dipolo interage com o átomo, criando-se uma situação dipolo-dipolo induzido; (3) interações de *Keesom* que se manifestam quando duas moléculas se aproximam criando interações dipolo-dipolo.

A intensidade das forças de *van der Waals* é diretamente proporcional ao tamanho dos corpos que se interagem e varia na razão inversa da distância à superfície.

Os microrganismos apresentam cargas negativas em sua superfície quando em soluções com pH neutro, no entanto a carga superficial do microrganismo pode ser alterada dependendo do pH do meio onde se encontra. Na superfície dos microrganismos existem grupos ácidos (carboxílicos e fosfatos) e básicos (grupos amina) que reagem com os íons OH^- e H_3O^+ da solução.

A superfície de um sólido eletricamente carregado em contato com uma solução aquosa atrai íons de sinal contrário do meio e simultaneamente repele os íons de sinais iguais. Este mecanismo juntamente com o efeito oposto dos movimentos *Brownianos* cria uma camada difusa denominada dupla-camada elétrica.

O potencial eletrostático que se estabelece devido a diferentes concentrações de cargas no interior da dupla-camada elétrica tem a designação de potencial de dupla camada elétrica e o seu valor diminui através da camada difusa desde o valor do potencial da superfície até atingir o valor nulo no seio da solução aquosa.

A teoria DLVO apresenta alguns desvios por considerar somente as forças de longo alcance (forças de van der *Waals* e forças resultantes da interação

da dupla cama elétrica). As forças de curto alcance permitem justificar os desvios da teoria DLVO, contudo estas interações (com exceção as interações hidrofóbicas) são difíceis de serem quantificadas (AZEREDO, 1998).

3.8.2 Forças de Curto Alcance

Quando uma partícula chega próximo o suficiente de uma superfície, um grupo de forças de curto alcance passa a dominar a interação. Portanto, a teoria DLVO só permite prever a adesão mais próxima do substrato, mas não permite quantificar a energia potencial dessa interação.

As Forças de curto alcance, também denominadas de forças não DLVO envolve as forças de repulsão de Born, as forças de hidratação, as interações hidrofóbicas, as interações estéricas e as pontes poliméricas.

3.8.3 Teoria XDLVO (Derjaguin e Landau (1941), Verwey e Overbeek (1948), van Oss (1994)

A teoria DLVO explica a adesão de microrganismo com base na interação entre partículas coloidais e despreza todos os aspectos microbiológicos da adesão. As forças de interação contabilizada na teoria DLVO são, fundamentalmente, forças de longo alcance. Portanto, esta teoria só pode prever se os microrganismos se aproximam a certa distância da superfície.

A teoria termodinâmica permite quantificar a energia envolvida na adesão e, portanto prever de forma quantitativa a possibilidade de se estabelecer uma interface superfície de adesão/microrganismo. Contudo, nesta teoria as interações eletrostáticas não são contabilizadas e são muito importantes em meios aquosos. Assim, a teoria termodinâmica só pode ser aplicada se a barreira de energia que separa as duas superfícies for ultrapassada.

Em 1994, van Oss adicionou à teoria DLVO os aspectos termodinâmicos da adesão e tais como o cálculo de Interações de *Lifshitz-van der Waals*, ácido-base de *Lewis*, Forças da dupla camada elétrica e movimentos

Brownianos. Esta teoria foi denominada teoria XDLVO. Entretanto, este termo tem sido pouco utilizado e vários autores quando estudam aderência utilizam o termo teoria DLVO ou DLVO estendida (BOS; van den MEI; van PELT, 1999; SMETS et al., 1999; STREVETT; CHEN, 2003).

Quando duas partículas ou macromoléculas imersas numa solução aquosa se aproximam, as primeiras forças de interação que se estabelecem entre as duas superfícies são: Interações de *Lifshitz-van der Waals* (LW); interações ácido-base de *Lewis* (interações AB); forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (interações DL); interações resultantes de movimentos *Brownianos* (interações BR).

A energia livre total destas interações é resultante do somatório das energias livres de cada uma das forças de interação, segundo a equação seguinte:

$$\Delta G^{\text{TOT}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}} + \Delta G^{\text{DL}} + \Delta G^{\text{BR}}$$

Na a teoria DLVO só as interações de *van der Waals-London* são quantificadas. As interações de *Lifshitz* (1955) consideram as outras interações eletrodinâmicas (*van der Waals-Keesom* e *van der Waals-Debye*) e as quantificam da mesma maneira que as interações de *van der Waals-London*.

As forças de interação de *Lifshitz-van der Waals* são consideradas também forças de interação apolares porque se estabelecem entre moléculas apolares da superfície das partículas. A energia livre resultante das interações apolares está diretamente relacionada com a tensão da superfície.

Em meios aquosos, as forças de interação polares são devidas principalmente a interações entre doadores e elétrons e receptores de elétrons, que representam interações do tipo ácido-base de *Lewis* geralmente designadas AB (van OSS et al., 1987). As forças de interação dos receptores de elétrons podem ser diferentes das forças de interação relacionadas aos dos doadores de elétrons. Logo, estas duas forças de interação são consideradas assimétricas (van OSS et al., 1987) e γ^+ representa o parâmetro da tensão superficial devido à capacidade de aceitar elétrons e γ^- o parâmetro da tensão superficial devido à capacidade de doar elétrons.

Todas as partículas ou moléculas em suspensão apresentam movimentos *Brownianos*. As forças resultantes dos movimentos *Brownianos* são repulsivas e desempenham um papel muito importante nas interações entre macromoléculas em meio aquosos.

3.9 HIDROFOBICIDADE

Uma superfície que não possui grupos polares ou iônicos ou locais de ligação de hidrogênio a sua superfície não tem afinidade pela água e é considerada hidrofóbica. As interações hidrofóbicas apesar de serem consideradas de curto alcance, podem, em determinados casos, ocorrer até 80 nm da superfície e apresentar energias potenciais de interação duas vezes maiores do que a interação de van der Waals (AZEREDO, 1998; PASHLEY; ISRAELACHVILI, 1984)

Hidrofobicidade é um entre os vários fatores envolvidos na aderência inicial de um microrganismo em uma superfície (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

A importância do caráter hidrofóbico da superfície das células na adesão tem sido explicada por Busscher et al. (1987). Para que uma adesão entre duas superfícies em meio aquoso ocorra, é preciso que o filme de água que as separa seja removido e a hidrofobicidade das superfícies contribui para essa remoção. A hidrofobicidade de uma superfície foi considerada durante muito tempo um parâmetro qualitativo e segundo Adamson (1982), uma superfície é considerada hidrofóbica quando não consegue ser molhada pela água e o seu caráter hidrofóbico pode ser avaliado pelo ângulo de contato que uma gota de água forma sobre a superfície. van Oss e Gieese (1995) definiram um critério quantitativo que permite avaliar a hidrofobicidade da superfície de minerais a partir da energia de coesão entre as moléculas da superfície imersas em água.

As características termodinâmicas dos microrganismos são determinadas principalmente pela membrana externa. A hidrofobicidade das bactérias Gram negativas aumenta significativamente quando diminui a umidade porque a membrana externa tem grande quantidade de lipídios e pouco peptidoglicano, sendo a propriedade termodinâmica facilmente influenciada pela umidade do meio. Contudo isso não ocorre nas das Gram positivas que possuem propriedades termodinâmicas de superfície relativamente estável devido grande quantidade de peptidoglicano, que lhe confere uma maior resistência à umidade (STREVETT; CHEN, 2003).

A maioria dos métodos existentes não permite determinar um valor quantitativo de hidrofobicidade, limitando-se a fazer a comparação entre microrganismos mais ou menos hidrofóbicos. Entre os vários métodos descritos e

amplamente utilizados para determinar a hidrofobicidade (HOOD; ZOTOLLA, 1995) podemos citar a medida do ângulo de contato, adesão microbiana a hidrocarbonetos (BATH), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), adesão a superfícies hidrofóbicas (MAHS), agregação por adição de sais “salting out” (SAT) e partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico (PEG).

Esses métodos foram reportados por vários autores e apresentam vantagens e desvantagens (DICKSON; KOOHMARAIE, 1989). A técnica do ângulo de contato será descrita com maiores detalhes por ter sido a técnica utilizada neste estudo.

3.9.1 Medição de Ângulo de Contato

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através da medida do chamado ângulo de contato θ , considerado um método clássico usado para determinar energias livres de superfície. Ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida é ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme esquematizado na Figura 2.

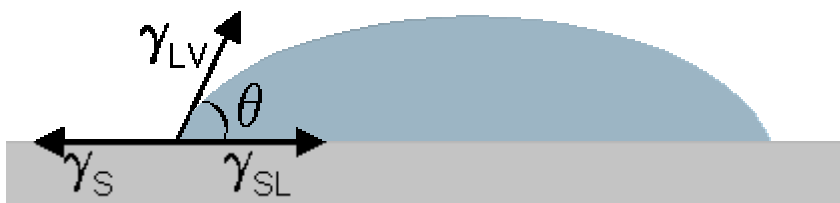


Figura 2 – Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. Nesta figura, γ_S e γ_{LV} são a energia de superfície do sólido e a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, respectivamente; γ_{SL} é a energia da interface sólido – líquido.

O ângulo formado por um líquido sobre uma superfície permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Se o líquido for a água, então o ângulo

formado será relacionado com a hidrofobicidade da superfície. Para ângulos de contato inferiores a 50° a superfície é considerada hidrofílica e se o ângulo for superior a 50° será hidrofóbica (van OSS; GIESE, 1995). Mas de acordo com Vogler (1998) para considerar uma superfície hidrofóbica esta deve apresentar ângulo de contato com a água maior do que 65° , por outro lado superfícies hidrofílicas devem apresentar ângulo de contato com a água menor que 65° .

A equação de Young (FOWKES, 1964) estabelece a relação entre o ângulo de contato e os componentes da tensão superficial:

$$\cos \theta_{\gamma_{LV}} = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}}$$

em que γ_{LV} representa a energia livre da interface líquido-vapor, γ_{sv} a energia livre da interface sólido-vapor e γ_{sl} a energia livre da interface sólido-líquido. A partir da equação de Young, estabeleceram-se outras equações que permitem o cálculo das tensões superficiais de um sólido.

Segundo van Oss et al. (1987), a relação entre o ângulo de contato (θ) formado por um líquido sobre uma superfície e os componentes de tensão superficial é determinada pelo somatório entre os componentes apolar (γ^{LW} : Lifshitz-van der Waals) e polar ($\gamma^{AB} = 2 \times \sqrt{\gamma^+ \gamma^-}$: Lewis ácido-base)

A equação completa de Young-Good-Girifalco-Fowkes, relaciona o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida com as componentes da tensão superficial do líquido e da superfície tais como:

γ^+ componente acceptor de elétrons do componente ácido-base da tensão superficial

γ^- componente doador de elétrons do componente ácido-base da tensão superficial

γ^{LW} Componente de tensão superficial apolar de *Lifshitz-van der Waals* calculado a partir dos ângulos de contatos.

γ^{AB} Componente de tensão superficial polar de ácido-base de *Lewis* calculado a partir dos ângulos de contato.

Para a obtenção dos três componentes da tensão superficial de um sólido é necessário determinar o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes, de acordo com a metodologia esquematizada no Apêndice 1.

Os líquidos utilizados preferencialmente são os apolares di-iodometano e o α -bromonaftaleno e os polares a água e a formamida.

Este método deve ser utilizado sobre superfícies homogêneas, planas, lisas e secas o que torna a sua aplicação a microrganismos bastante difícil (JOHNSON et al., 1977). Devido a essas limitações, desenvolveram-se algumas estratégias na preparação das células de forma a minimizar os desvios à execução ideal da técnica. Uma das estratégias consiste na construção de um filme plano de microrganismos, obtido por filtração de uma suspensão através de uma membrana de baixa porosidade (BUSSCHER et al., 1984; van der MEI et al., 1987). A deposição das células na membrana deve ser a mais homogênea possível e a secagem da membrana é um dos passos críticos do processo (BUSSCHER et al., 1984). Uma das grandes limitações deste método é a dificuldade de medir o ângulo formado, uma vez que a porosidade do filme de células provoca rápida absorção da água. Apesar desta dificuldade, é um dos métodos mais importantes uma vez que é o único que permite obter uma estimativa universal da hidrofobicidade global das células (DOYLE; ROSENBERG, 1990).

van Oss e Giese (1995) desenvolveram uma metodologia de cálculo que permite quantificar a hidrofobicidade da superfície dos materiais através das componentes da tensão superficial. Segundo estes autores, a hidrofobicidade é expressa em termos de energia hidrofóbica de atração e define o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água.

De acordo com este critério, a hidrofobicidade é definida em termos de energia livre de interação entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w), (Δ_{sws}). Quando a energia livre global de interação entre as moléculas imersas em água é atrativa (Δ_{sws} é negativo), significa que as moléculas do sólido têm menor afinidade pela água do que entre si. Assim, uma superfície hidrofóbica apresenta valores de Δ_{sws} negativos. Quando a energia livre global de interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva (Δ_{sws} é positivo) a superfície do sólido é considerada hidrofílica.

Quanto maior for o valor absoluto de Δ_{sws} mais hidrofóbica (valores negativos) ou mais hidrofílica (valores positivos) é a superfície.

Dickson e Koohmaraie (1989) testaram a técnica de ângulo de contato, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e adesão microbiana a

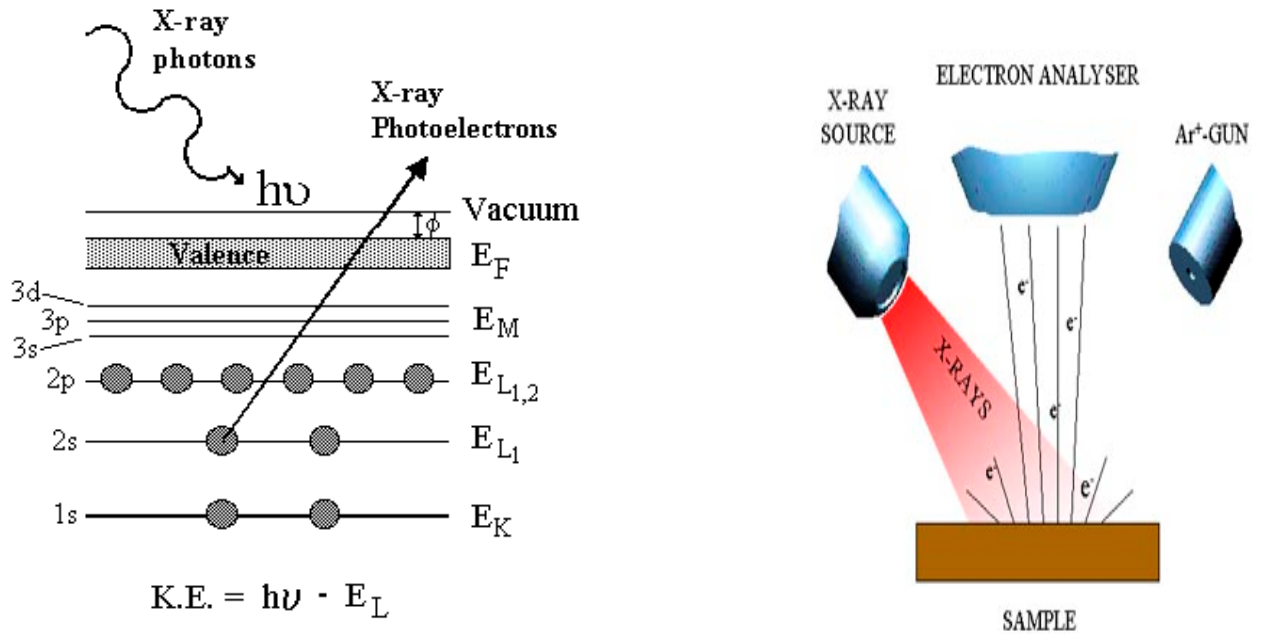
hidrocarbonetos (BATH) e encontraram uma correlação entre ângulo de contato e BATH e HIC, porém não entre as duas últimas técnicas.

3.10 A TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS X - (X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY) - XPS

A XPS fornece informações sobre os elementos e os componentes químicos funcionais da parte mais externa da superfície celular (2 a 5 nm), sendo principalmente utilizada na investigação de mudanças química e estrutural dos elementos presentes na superfície microbiana. A relevância da XPS para investigar a superfície microbiana é amparada pelas correlações entre os resultados do XPS e as propriedades superficiais das células. A composição superficial determinada por XPS é convertida em composição molecular, em termos de proteínas, polissacarídeos e componente hidrocarbônico (ROUXHET, et al., 1994; BOONAERT; ROUXHET, 2000).

A XPS é muito utilizada em combinação com outros métodos morfológicos, imunológicos, bioquímicos e físico-químicos para investigar a superfície bacteriana.

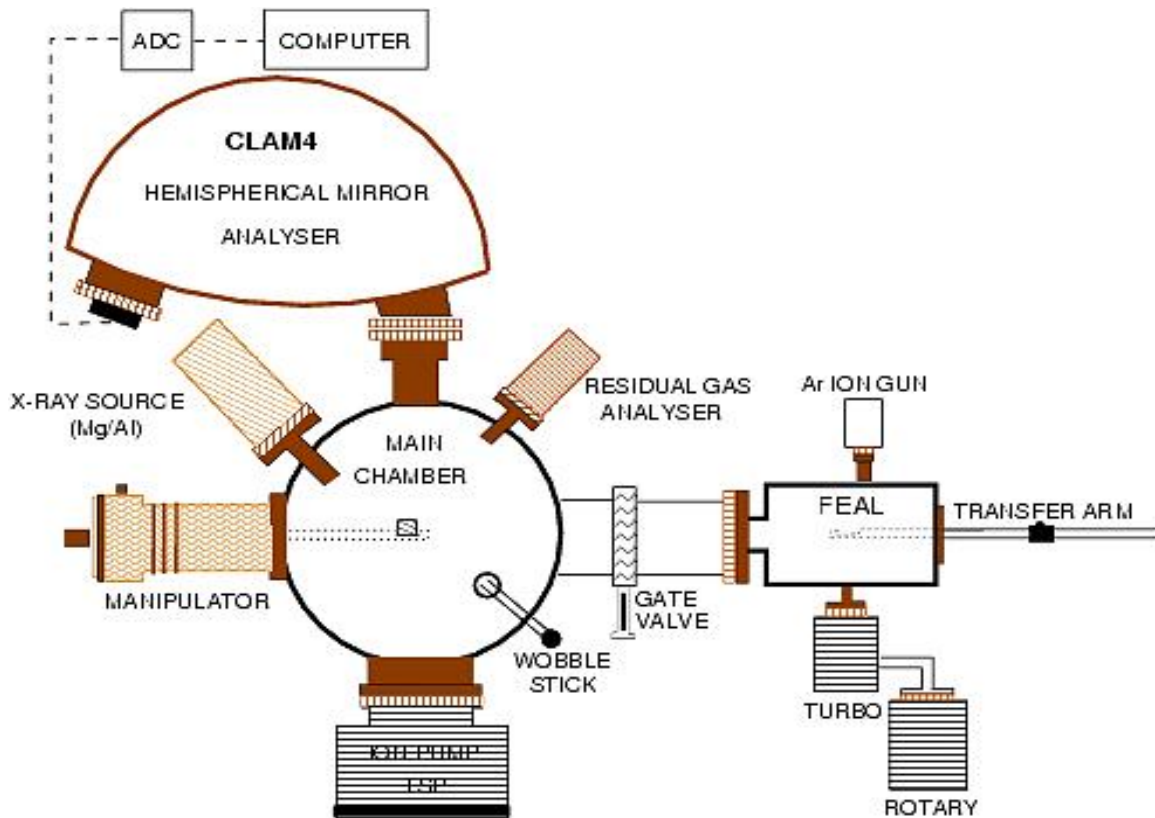
XPS envolve a exposição da amostra a um feixe de raio X de baixa energia para emissão de elétrons (Figura 3). A energia cinética emitida do centro de elétrons (fotoelétrons) é analisada, e sua energia de ligação E_B , determinada de acordo com o efeito fotoelétrico $E_B = hv - E_e$, onde hv é a energia da radiação incidente (raio-x) e E_e é a medida da energia cinética do fotoelétron. O espectro é obtido e plotado em número de elétrons por intervalo de energia (ROUXHET et al., 1994; BEECH, 2004).



Fonte: :www.hkbu.edu.hk e www.sckcen.be
Data: 27/08/05

Figura 3 – Irradiação das amostras por feixe de raios X

Basicamente um equipamento de XPS é composto de uma câmara de ultra-alto vácuo (UHV), uma fonte raios X, um canhão de íons, um manipulador de amostra, um espectrômico, um detector de elétrons e um computador para a aquisição e tratamento de dados. Obviamente que dependendo do equipamento utilizado, a sua configuração pode mudar dependendo dos diferentes acessórios que podem compô-lo.



Fonte: www.iopb.res.in

Data: 28/08/05

Figura 4 – Esquema de um aparelho de XPS.

Como citado anteriormente, é necessário utilizar a câmara de UHV para que a superfície a ser analisada esteja livre de gases adsorvidos e contaminantes. Isso se dá pelo fato de que os elétrons podem colidir com moléculas de gases residuais, necessitando assim de um livre caminho médio suficiente ≥ 10 cm para atingir a amostra ou o detector, sendo necessárias pressões menores que 10^{-5} Pa. O bombardeamento sobre a superfície por íons de gases inertes, como por exemplo, o de Ar^+ , pode ser feito com o propósito de obter uma superfície mais limpa. Para essa finalidade, o aquecimento também pode ser utilizado (RIBEIRO et al., 2005).

A fonte de fótons em um equipamento de XPS gera raios X de baixa energia, produzida a partir de um ânodo de alumínio ou de magnésio. Para o caso do alumínio, o intervalo do espectro de raios X utilizado é 0-1200 eV e para o magnésio de 0-1400 eV. A figura 4 exibe o esquema de um equipamento de XPS.

A composição química como nitrogênio, oxigênio, carbono ligado a carbono, e carbono ligado a hidrogênio, está relacionado a hidrofobicidade de superfície (ROUXHET et al., 1994). As propriedades termodinâmicas da superfície microbiana refletem as propriedades físico-químicas do microrganismo, as quais são controladas por componentes macromoleculares como, por exemplo, lipopolisacarídeos, proteínas e exopolímeros, que variam em quantidade com as condições de crescimento e de cepa para cepa. A quantidade de componentes macromoleculares pode ser representada por uma variedade de grupos funcionais (STREVETT; CHEN, 2003). Em trabalhos anteriores a hidrofobicidade da superfície celular, calculada por ângulo de contato, foi relacionada com a concentração de nitrogênio ou carbono na forma de hidrocarbono e inversamente relacionado com a concentração de oxigênio (ROUXHET et al. 1994; BOONAERT; ROUXHET, 2000).

Recentemente, Chen e Strevett (2001) demonstraram que características superficiais microbianas contribuem para a superfície termodinâmica, onde eles observaram que os grupos funcionais como RCOH e RCOO⁻ favorece γ^- (componente doador de elétrons do componente ácido-base da tensão superficial) e grupos funcionais como -H=CH e >C=CH₂ enfraquece γ^- .

3.11 RUGOSIDADE DOS MATERIAIS

A rugosidade dos materiais influencia na formação do biofilme (TAYLOR; HOLAH, 1996), mas parece ser menos importante em relação à adesão inicial (BAULANGE-PETERMANN et al., 1997).

Embora alguns autores correlacionam o aumento do desenvolvimento de biofilme com a maior rugosidade da superfície (BARNES et al., 1999; HENRIQUES et al., 2004), outros estudos não mostram essa correlação (VERRAN et al., 2001; ASSANTA et al., 2002). Contudo, o aparente conflito entre essas duas observações pode estar relacionada com grau da rugosidade da superfície estudada. Flint et al. (2000) encontraram dificuldades em relacionar a rugosidade e a adesão de estreptococo ao aço, mas observaram uma maior adesão com rugosidade média R_a de 0,9 μm, sugerindo que como é próximo ao tamanho

das células (1,0 μ m) acaba retendo os microrganismos involuntariamente. Assim, atualmente vem sendo discutido o conceito da diferença entre porosidade e rugosidade de superfícies.

Micrografias dos microrganismos aderidos aos substratos raramente mostram a preferência em adesão em arranhaduras ou sulcos ou em se orientar acompanhando a linha de polimento (BARNES et al., 1999; BOS et al., 1999). Quando as superfícies apresentam fendas e fissuras estas funcionam como armadilhas para os microrganismos. Assim uma superfície rugosa pode ser preferencialmente colonizada, porque proporciona locais onde os microrganismos estão protegidos do estresse do ambiente, da turbulência do líquido que envolve e da atividade dos biocidas (MORTON et al., 1998; KUMAR; ANAND, 1998; FLINT et al., 2000).

A influencia da rugosidade da superfície sobre a formação do biofilme esta mais relacionada a dificuldades envolvidas na limpeza de uma superfície rugosa. A remoção através dos procedimentos rotineiros de limpeza (esfregar com força), não ocorre e resulta em um rápido re-crescimento do biofilme e em transferência deste microrganismo. Assim são necessários métodos mais eficientes como pulverizadores (HOOD; ZOTTOLA, 1995; BOS et al., 1999; VERRAN et al., 2001).

Muitos pesquisadores relatam o grau da rugosidade das superfícies de forma subjetiva, como por. ex. polido e não polido. Para determinar a rugosidade de uma determinada superfície é necessário saber qual a latitude empregada, quais filtros são utilizados para separar as formas e as ondulações e expressar os valores encontrados.

Na análise da rugosidade alguns parâmetros são analisados como R_a , R_q e R_z (Figura 5, 6, 7). R_a é a média aritmética do valor absoluto das distâncias da linha média ao perfil R dentro da latitude da amostra. É calculada em micrometros e é o parâmetro mais geral e comumente utilizado para descrever a rugosidade, porque descreve matematicamente o que se entende de forma mais intuitiva o conceito de rugosidade. R_q é o valor médio da raiz quadrada dos desvios do perfil em relação à linha média, dentro da longitude da amostra. Um parâmetro mais sensível que R_a e tem um significado estatístico que é o desvio padrão das alturas do perfil. R_z é o valor em micrometros dos valores absolutos dos cinco picos mais

altos mais o valor médio absoluto dos cinco vales mais profundos, dentro da latitude da amostra (SURFTEST SV 512).

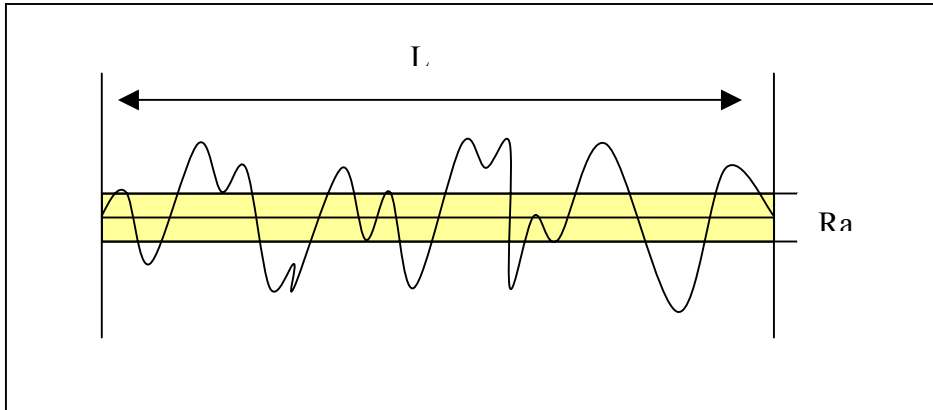


Figura 5 – Rugosidade Média (R_a)

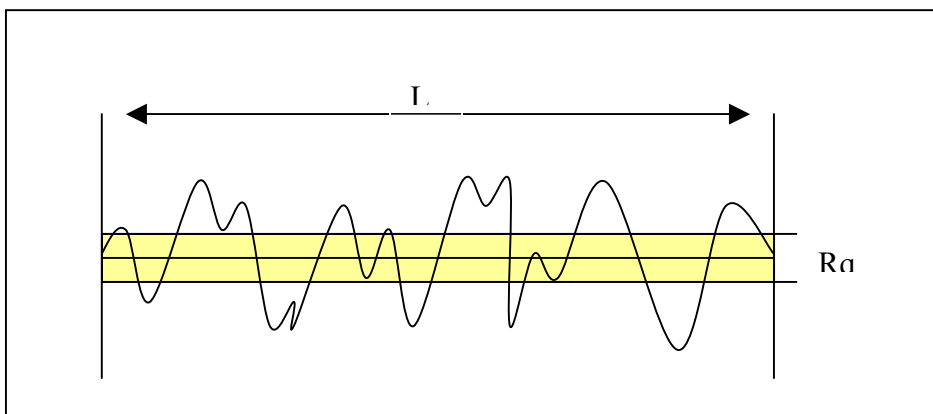


Figura 6 – Média da raiz quadrada dos desvios do perfil (R_q)

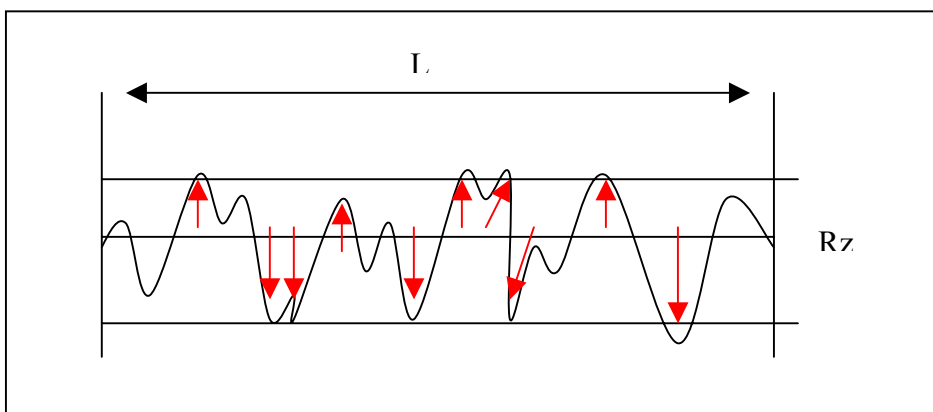


Figura 7 – R_z Média dos dez pontos mais irregulares

3.12 SUPERFÍCIES ESTUDADAS

3.12.1 Aço

Segundo relatos, o aço inoxidável foi descoberto por acaso. Em 1912, o inglês Harry Brearly verificou que a liga Fe-Cr (13%) que estudava resistia à maior parte dos reagentes utilizados na época em metalografia e deu o nome à liga de "stainless steel" ("aço que não mancha").

Um ano mais tarde na Alemanha, Eduard Maurer observou que uma liga de Fe-Cr que continha cerca de 8% de Ni, além dos elementos da liga de Brearly, resistiu por vários meses a vapores agressivos. Atualmente, sabe-se que os aços descobertos por Brearly e Maurer são o AISI 420 (martensítico) e o AISI 302 (austenítico), respectivamente. No início do século 20, era difícil compreender que aquecendo-se duas ligas a altas temperaturas (1.000 °C) e resfriando-as rapidamente era possível obter duas ligas completamente diferentes (http://www.revistapesquisa.fapesp.br/show.php?id=revistas1.fapesp1..20020326.20020474..SEC7_3)

O aço inoxidável pode ser definido como um grupo de ligas ferrosas resistentes à oxidação e corrosão, que contem no mínimo 12% de cromo. A resistência à oxidação e corrosão do aço inoxidável se deve, principalmente, à presença do cromo. A partir de um determinado valor e em contato com o oxigênio, o cromo permite a formação, sobre a superfície do aço, de uma película finíssima de óxido de cromo, que é impermeável e insolúvel nos meios corrosivos usuais. O níquel pode ser adicionado, aumentando a resistência à corrosão de uma maneira geral. O cromo e o níquel têm sido os elementos primordiais dos aços inoxidáveis (<http://www.acesita>).

Outros elementos podem estar presentes, como o molibdênio, nióbio, silício, alumínio e titânio, em proporções que caracterizam a estrutura, propriedades mecânicas e o comportamento final do aço inoxidável.

Molibdênio e cobre podem ser utilizados com a finalidade de aumentar a resistência à corrosão por via úmida. O silício e o alumínio melhoram a resistência à oxidação a altas temperaturas. O titânio e o nióbio são elementos "estabilizadores" nos aços austeníticos, impedindo o empobrecimento de cromo, que

provocaria uma diminuição da resistência local à corrosão. Existem ainda outros elementos que modificam e melhoram as características básicas dos aços inoxidáveis, como o manganês, o nitrogênio, o cobalto, o boro e as terras raras, porém apresentam finalidades de adição muito específica.

O aço inoxidável tem sido o material escolhido para o uso nas superfícies de trabalho ou pias de cozinhas. É um material de fácil fabricação, resistente a fortes choques mecânicos, relativamente resistentes ao ataque químico por agentes oxidantes e outros sanitizantes (KUSUMANINGRUM et al., 2003; ROSSONI; GAYLARDE, 2000). Pias de cozinhas também têm sido fabricadas com materiais como, policarbonato, resinas de minerais e alguns tipos de aço esmaltado. Porém, embora estes materiais quando novos apresentam a mesma facilidade de limpeza que o aço inoxidável, são menos resistentes a abrasão e ao impacto e são mais difíceis de serem higienizados (KUSUMANINGRUM et al., 2003).

Vários tipos de aço inoxidável são utilizados em cozinha e nas indústrias de alimentos. Vários estudos já foram realizados utilizando o aço 304 (HOOD; ZOTTOLA, 1997a; AUSTIN et al., 1998; ROSSONI; GAYLARDE, 2000; ASSANTA et al., 2002; KUSUMANINGRUM et al., 2003; CARPENTIER; CHASSAING, 2004; ZHAO, et al., 2004) e o 316 (GIBSON et al., 1999; PARKER et al., 2001).

O aço 316 contém no máximo 0,03% de carbono, e cromo, níquel e molibdênio na proporção de 17%, 11% e 2,5%, respectivamente. O aço 304 normalmente contém cromo e níquel em proporção de 18% e 9%, e no máximo 0,07% de carbono. A diferença fundamental é que o aço 316 contém molibdênio e o 304 não (FLINT et al., 2000).

O aço 304 tem sido utilizado para utensílios domésticos; indústria frigorífica, tanques de fermentação e estocagem de cerveja; equipamentos para refino de produtos de milho; equipamentos para leiteria; peças para depósito de algumas bebidas carbonatadas; válvulas e peças de tubulações e condutores descendentes de águas pluviais. O aço 316 é utilizado, principalmente, na fabricação de peças que exigem alta resistência à corrosão localizada. Na indústria de alimentos é empregado com maior frequência em equipamentos criogênicos e cubas de fermentação.

3.12.2 Granito

O granito é composto por diversos minerais. A terminação “ito”, em português, significa “rocha”.

Rocha é um agregado de um ou vários minerais, formando as grandes massas da crosta terrestre. Em certos casos a rocha pode ser formada de uma só espécie mineral, como é o caso do calcário, constituído unicamente por calcita, folhelhos, formados por argila, ou quartzito, formado predominantemente por quartzo. Entretanto, as rochas comumente são constituídas por mais de um mineral, alguns presentes em maior quantidade, chamados de essenciais e outros em pequena proporção denominados de minerais acessórios.

Uma rocha muito comum é o granito, formado por quartzo, feldspato alcalino e mica, podendo conter como minerais acessórios entre outros, anfibólios, apatita, turmalina, zirconita e magnetita. O granito é denominado de rocha Ígnea ou magmática (plutônicas ou intrusivas), que são rochas resultantes da consolidação do magma.

O granito é muito utilizado como bancadas de cozinha devido a sua composição. Em um estudo sobre a topografia do granito foi encontrada fendas e vales que podem reter microrganismos durante o procedimento de limpeza.

2.12.3 Polietileno

O polietileno é um polímero termoplástico formado pela aglomeração de unidades monoméricas de etileno, derivadas do petróleo. O etileno é um gás que se desprende da nafta durante o processo de fracionamento, na indústria petroquímica. As moléculas do etileno contêm dois de carbono e quatro de hidrogênio e peso atômico de 28 (Figura 8). O etileno polimerizado forma o polietileno que é um material sólido com um peso molecular de 60 kDa. O polietileno é inerte em comparação à maioria dos produtos químicos, devido à sua natureza parafínica, ao seu alto peso molecular e à sua estrutura parcialmente cristalina. Anteriormente, o polietileno era classificado pela sua densidade e pelo tipo de

processo usado em sua fabricação. Atualmente, são classificados polietilenos ramificados e lineares.

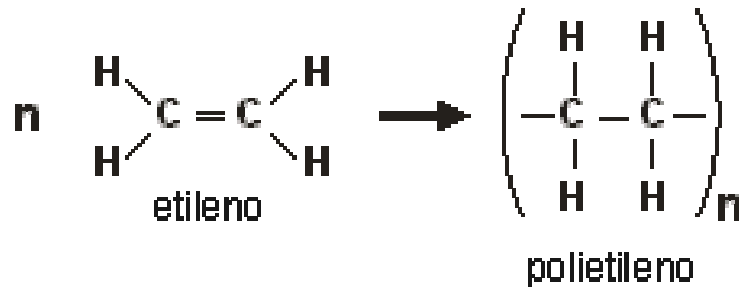


Figura 8 – Estrutura química do Polietileno

Dependendo das condições reacionais e do sistema catalítico empregado na polimerização, cinco tipos diferentes podem ser produzidos: polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno linear de baixa densidade (PELBD), polietileno de ultra baixa densidade (PEUDB),.

PEBD tem cadeia ramificada e o PEAD cadeia linear. Esses dois tipos têm muitas aplicações em comum, mas em geral, o PEAD é mais duro e resistente e o PEBD é mais flexível e transparente (COUTINHO et al., 2003).

PEBD apresenta ponto de fusão em torno de 115°C, densidade na faixa de 0,91 a 0,94, índice de refração de 1,51 a 1,52, alta resistência a substâncias ácidas e alcalinas e 50 a 60% de cristalinidade. PEBD tem sido utilizado na fabricação de filmes plásticos e laminados para embalagem de produtos alimentícios líquidos e sólidos, filmes laminados e plastificados para produtos farmacêuticos e hospitalares, utensílios domésticos, brinquedos e sacos de lixo (SÁ SILVA et al., 2002)

A adesão de microrganismos e a formação de biofilme foram observadas em polietileno (JOSEPH et al., 2001; ASSANTA et al., 2002). Gough; Dodd (1998) a possibilidade de contaminação de alimentos por tábuas de corte de madeira e de polietileno. Esses autores observaram maior permanência de *Salmonella* Typhimurium em tábuas de madeira devido a dificuldade de higienização quando comparada com a tábua de polietileno.

3.12.4 Polipropileno

O polipropileno é um dos plásticos mais vendidos e que mostra a maior taxa de crescimento de uso anual no mundo, devido às suas excepcionais propriedades e versatilidade de uso (www.suzanopetroquimica.com.br).

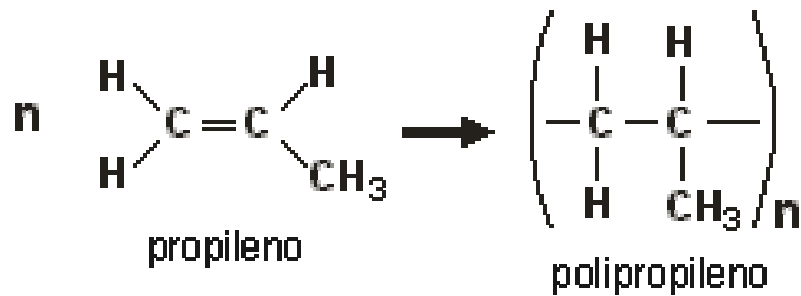


Figura 9 – Estrutura química do Polipropileno

O polipropileno é um termoplástico semicristalino, produzido através da polimerização do monômero propeno, usando um catalisador estereoespecífico formando cadeias longas. O polipropileno é feito pela formação de longas cadeias de monômero de propeno. O monômero base, propeno, é um gás à temperatura ambiente extraído do petróleo, mas quando é unido forma cadeias longas de moléculas chamadas de polímero, que é o polipropileno em si (www.suzanopetroquimica.com.br).

A maior parte do polipropileno comercial é do tipo "isotático", em que a maioria das unidades de propeno está com a "cabeça" unida à "cauda", formando uma cadeia com todos os grupos metila orientados para o mesmo lado. Esta estrutura estereorregular favorece o desenvolvimento de regiões cristalinas que, dependendo das condições de processamento, permite obter uma cristalinidade entre 40 e 70%.

O segredo de criar uma forma isotática de polipropileno reside no catalisador usado para dirigir esta reação: o catalisador correto deve alinhar as moléculas para assegurar que elas encontrem a forma certa de se unirem à cadeia. Os catalisadores usados para a polimerização do propeno são geralmente uma mistura de compostos de titânio e alumínio. O polipropileno sai do reator na forma de

pequenas partículas ou esferas, que vão para uma extrusora, onde são adicionados os aditivos e então granuladas. Esta é a forma que o polipropileno é comercializado, e as indústrias o transformam em artigos finais. O polipropileno é mais duro e resistente ao calor, quando comparado com o polietileno.

Recentemente tem sido promovido o uso de materiais plásticos na indústria de alimentos e em vários estudos tem sido conduzido a adesão de microrganismos ao plástico de maneira geral e ao polipropileno especificamente (MAFU et al., 1990; POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; ARAÚJO et al., 2004).

REFERÊNCIAS

APPLEGATE, B.; BRYERS, J.D. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. **Biotech. Bioengi.**, v. 37. p. 17-25, 1991.

ABSOLOM, D.R.; LAMBERTI, F.V.; POLICOVA, Z.; ZINGG, W.; van OSS, C.J.; NEUMANN, W. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. **Appl. Environ. Microbiology**, Washington, v. 46, p. 90-97, 1983.

ADAMSON, A.W. **Physical chemistry of Surfaces**. New York: Wiley-Interscience, 1982.

AMORY, D. E.; GENET, M. J.; ROUXHET, P.G. Application of XPS to the surface analysis of yeast cells. **Surf. Interface Anal**, v. 11, no. 9, p. 478-486, 1988.

ARAUJO, J.C.; MORTARA, R.; CAMPOS J.R.; VAZOLLER, R. F. Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Environ. Technol**, London, v. 25, p. 809-817, 2004.

ASSANTA, M. A.; ROY, D.; LEMAY, M-J.; MONTPETIT, D. Attachment of *Arcobacter butzleri*, a New Waterborne Pathogen, to Water Distribution Pipe Surfaces. **J. Food Prot**, Des Moines, US, v. 65, no. 8, p. 1240-1247, 2002.

AUSTIN, J. W.; SANDERS, G.; KAY, W. W.; COLLINSON, S. K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **Fems Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 162, p. 295-301, 1998.

AZEREDO, J. C. V. R. Adesão de microrganismos e composição da matriz de bioagregados. Braga, 1998, 231p. **Tese (Doutorado)**– Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 1998.

BARNES, L. M.; LO, M.F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, A. H. L. Effect of milk proteins on adhesion of bacterial to stainless steel surfaces. **Appl. Environ. Microbiology**, Washington, US, v. 65, p. 4543-4548, 1999.

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – current understanding and state-of-the art methods of study. **Int. Biodeterior. Biodegrad**, Barking, GB, v. 53, p. 177–183, 2004.

BLACK, J. G. **Microbiologia**: fundamentos e perspectivas, 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

BONAFONTE, M. A.; SOLANO, C.; SESMA, B.; ALVAREZ, M.; MONTUENGA, L.; GARCÍA-ROS, D.; GAMAZO, C. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. **Fems Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 191, p. 31-36, 2000.

BOONAERT, C. J. P.; ROUXHET, P. G. Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties. **Appl. Environ. Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2548-2554, 2000.

BOS, R.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **Fems Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 23, p. 179-230, 1999.

BOULANGE-PETERMANN, L.; RAULT, J.; BELLON-FONTAINE, M.-N. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. **Biofouling**, Chur, Suíça, v. 11, p. 201-216, 1998.

BRUINSMA, G. M.; RUSTEM-ABBING, M.; van der MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 45, p. 95-101, 2001.

BRUINSMA, G. M.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. **Biomaterials**, Surrey, GB, v. 22, p. 3217-3224, 2001.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; van der MEI, H. C.; van PELT, A. W.; DE JONG, H. P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Appl. Environ. Microbiology**, Washington, v. 48, p. 980-983, 1984.

BUSSCHER, H. J. and WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 46, p. 165-173, 1987.

Catálogos diversos da Acesita, em www.acesita.com.br .(Ciro de Tolelo Piza Taberchersni). Acesso: 25 de outubro de 2005.

CARPENTIER, B.; CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 97, p. 111-122, 2004.

CARRAMIÑANA, J. J.; YANGÜELA, J.; BLANCO, D.; ROTA, C.; AGUSTIN, A. I.; ARIÑO, A.; HERRERA, A. *Salmonella* Incidence and Distribution of Serotypes throughout Processing in a Spanish Poultry Slaughterhouse. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v. 60, no. 11, p. 1312-1317, 1997.

CHEN, Y.; JACKSON, K. M.; CHEA, F. P.; SCHAFFNER, D. W. Quantification and Variability Analysis of Bacterial Cross-Contamination Rates in Common Food Service Tasks. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v. 64, no. 1, p. 72-80, 2001.

CHEN, G. STREVETT, K. A. Impact of surface thermodynamics on bacterial transport. **Environ. Microbiol.**, Oxford, GB, v. 3, p. 237-245, 2001.

COUTINHO, F.M.B.; MELLO, I.L.; MARIA, L.C.S. Polietileno: Principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 13, n 1, p. 1-13, 2003.

CUNLIFFE, D.; SMART C. A.; ALEXANDER C.; VULFSON, E.N. Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, p.4995- 5002, 1999.

DAUTLE, M. P.; WILKINSON, R.; GAUDERER, M.W. L. Isolation and Identification of Biofilm Microorganisms from Silicone Gastrostomy Devices. **J. Pediatr. Surg.**, Philadelphia, US, v. 38, n 2, p. 216-220, 2003.

Den AANTREKKER, E. D.; BOOM, R. M.; ZWIETERING, M. H.; van SCHOTHORST, M. Quantifying recontamination through factory environments – a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam v. 80, p. 117-130, 2003.

DICKSON, J. S.; KOOHMARAIE, M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, n. 4, p. 832-36, 1989.

DOYLE, R.J. ; ROSENBERG, M. **Microbial cell surface hydrophobicity.** Washington, D. C: American Society of Microbiology, 1990.

FLINT, S. H.; BROOKSW, J. D.; BREMER, P. J. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **J. Food Eng**, Essex, GB, v. 43, p. 235-242, 2000.

FOWKES, F. M. **Contac Angle – Wettability and Adhesion**. American Chemical Society, Washington, 1964.

GASPARETTO, K. M. P. O. **Salmonella spp: Isolamento de carcaças de frango e estudo dos fatores de virulência**. Londrina, 2000, 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)– Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

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. **J. Appl. Microbiol**, Oxford, GB, v. 87, p. 41-48, 1999.

GOUGH, N. L.; DODD, C. E. R. The survival and disinfection of *Salmonella typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. **Food control**, Guildford, GB, v.9, p. 363-368, 1998.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Environ. Microbiol.**, Oxford, GB, v. 13, p. 228-233, 2002.

HAYASHI, H.; TSUNEDA, S.; HIRATA, A.; SASAKI, H. Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesion behaviors in terms of DLVO theory. **Coll. Surf. B: Bioint.**, v. 22, p.149-157, 2001.

HELKE, D. M.; SOMERS, E. B.; WONG, A. C. L. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. **J. Food Prot.**, Des Moines, US v.56, p.479-484, 1993.

HENRIQUES, M.; GASPARETTO, K.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, NL, v. 24, p. 1111-1115, 2002.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, R.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite, **Coll. Surf. B: Bioint**, v. 33, p. 235-241, 2004.

HENTZER, M.; TEITZEL, G. M.; BALZER, G. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. **J. Bacteriol**, Washington, US, v. 183, p. 5395-5401, 2001.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Guildford, GB, v. 6, p. 9-18, 1995.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems., **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 37, p. 145-153, 1997a.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **J. Food Prot**, Des Moines, US, v. 60, no. 9, p. 1034-1037, 1997b.

JOHNSON, R. E., DETTRE, R.H. and BRANDETH, D. A. L. **Colloid Interface Sci.**, v. 62, p. 205, 1977.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers., **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 64, p. 367-372, 2001.

KRYSINSKI, E. P.; BROWN, L. J.; MARCHISELLO, T. J. Effect of cleans and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v.55, p.246-25, 1992.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.42, p.9-27, 1998.

KUSUMANINGRUM, H.D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W.C. and BEUMER, R.R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 85, p. 227-236, 2003.

LIAO, CHIHG-HSING; SAPERS, G. M. Attachment and growth of *Salmonella* Chester on apple fruits and I vivo response of attached bacteria to sanitizer treatments. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v. 63, n. 7, p. 876-883, 2000.

LIU, Y.; YANG, S-F.; LI, Y.; XU, H.; QIN, L.; TAY, J-H. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment., **J. Biotechnol**, Amsterdam, v. 110, p. 251-256, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de BLOCK**, 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropilene and rubber surfaces after short contact times. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v. 53, p. 742-746, 1990.

MARSALL, K. C. Mecahanisms of adhesion. In: K. Marshall (Ed.) **Microbial adhesion and Aggregation**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 5-19.

MORTON, L. H. G.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARDE, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides., **Int. Biodeterior. Biodegrad**, Barking, GB, v. 41, p. 247-259, 1998.

PARKER, S.G., FLINT, S. H., PALMER, J. S., BROOKS, J. D. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. **J. Appl. Microbiol**, Oxford, GB v. 90, p. 901-908, 2001.

PASHLEY, R.M.; ISRAELACHVILI, J. N. DLVO and hydratation forces between mica surface in Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} chloride solutions. **J. Coll. Int. Sci.**, Orlando, FL, v.97, p. 446-455, 1984.

PEREIRA, M. O. B.O. Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de Biofilme. Braga, 2001, 209 f. **Tese (Doutorado)** – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

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

RIBEIRO, E. S.; FRANCISCO, M. S. P.; GUSHIKEM, Y.; GONÇALVES, J. E. **Princípios Básicos de XAS e XPS**. Chemkeys. Disponível em: www.chemkeys.com. Acesso em 10 out. 2005.

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

ROUXHET, P.G.; MOZES, N.; DENGIS, P.B.; DUFRÊNE, Y.F.; GERIN, P.A.; Genet, M.J. Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. **Coll. Surf. B: Bioint**, v. 2, p. 347-369, 1994.

RUSUL, G.; KHAIR, J.; RADU, S.; CHEAH, C. T.; YASSIN, R. M. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 33, p. 183-194, 1996.

SASAHARA, K. C.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v. 56, p. 1022-1028, 1993.

SÁ SILVA, C.A.; CABRAL, B.P.O.; SIMM, E.M.; ANDRADE, N.J. Polietileno para embalagem de leite: Adesão bacteriana e controle pela radiação ultravioleta. **Caderno Fazer Melhor**, maio/jun., p. 54-58, 2002. Disponível em: http://www.revistalaticinios.com.br/main_frame/revista/ed39/pdfs/fazermelhor.pdf. Acesso em: 14 de outubro de 2005.

SINDE, E. and CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiol.**, London, v. 17, p. 439-447, 2000.

SMETS, B. F.; GRASSO, D.; ENGWALL, M. A.; MACHINIST, B. J. Surface physicochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* and impact of adhesion and transport through porous media. **Coll. Surf. B: Bioint**, v.14, p. 1221-139, 1999.

SOCKETT, P. N. The Epidemiology and Costs of Diseases of Public Health Significance, in Relation to Meat and Meat Products. **J. Food Saf.**, Westport, US, v. 15, p. 91-112, 1995.

SPEERS, J. G. S.; GILMOUR, A. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 59, p.325-332, 1985.

STEELE, A.; GODDARD, D.T.; BEECH, I.B. An Atomic Force Microscopy Study of the Biodeterioration of Stainless Steel in the Presence of Bacterial Biofilms. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, Barking, GB, p 35-46, 1994.

STREVETT, K. A. and CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 329-335, 2003.

SURFTEST SV 512. La rugosidade superficial. **Guía rápida para el rugosímetro**. p. 18-25. ANO IND.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **TRENDS Microbiol.**, London, v. 9, no. 5, p. 222-227, 2001.

TEIXEIRA, J. A; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; SOUZA, M.; SIL, C. Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain., **Coll. Surf. B: Bioint**, v. 5, p. 197-203, 1995.

TAYLOR, J. H.; HOLAH, J. T. A comparative evaluation with respect to the bacterial cleanability of a range of wall and floor surface materials used in the food industry. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, GB, v. 81, p. 262-266, 1996.

van der MEI, H.C.; WEERKAMP, A.H.; BUSSCHER, H. J. A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of Streptococcal cell surfaces. **J. Microbiol. Methods**, v. 6, p. 277-285, 1987.

van OSS, C. J. **Interfacial Forces in Aqueous Media**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994.

van OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hidrophilicity and Hidrophobicity of clay minerals. **Clay Minerals**. London, GB, v. 43, p. 474-477, 1995.

van Oss, C. J, Chaudhury, M.K and Good, R. J. Monopolar surfaces. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, v. 28, p. 35-64, 1987.

VERRAN, J.; BOYD, R. D.; HALL, K.; WEST, R. H. Microbiological and Chemical Analyses of Stainless Steel and Ceramics Subjected to Repeated Soiling and Cleaning Treatments. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v. 64, v. 9, p. 1377-1387, 2001.

VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **Int. Biodeterior., Biodegrad.**, Barking, GB, v.49, p. 259-270, 2002.

VIEIRA, M. J.; OLIVEIRA, R.; MELO, L.; PINHEIRO, M. M.; MARTINS, V. Effect of metallic ions on the adhesion of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens.*, **Coll. Surf. B: Bioint.**, v. 1, p. 119-24, 1993.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Adv. Colloid Interface Sci.**, Amsterdam, 74, 69-117, 1998.

WONG, H-C.; CHUNG, Y-C.; YU, J-A. Attachment and inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. **Food Microbiol**, London, v. 19, p. 341-350, 2002.

WOODWARD, M. J.; SOJKA, M.; SPRINGS, K. A.; HUMPHREY, T. J. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. **Journal Medicine Microbiology**, v. 49, p. 481-487, 2000.

ZHAO, P.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; RUBINO, J. R.; MENG, J. Development of model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. **J. Food Prot.**, Des Moines, US, v. 61, NO. 8, p. 960-3, 1998.

ZHAO, Q.; LIU, Y.; ABEL, E. W. Effect of temperature on the surface free energy of amorphous carbon films. **J. Coll. Int. Sci.**, Orlando, FL, v. 280, p. 174-183, 2004.

APÊNDICE

1. Determinação da tensão superficial a partir do Ângulo de Contato

A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes

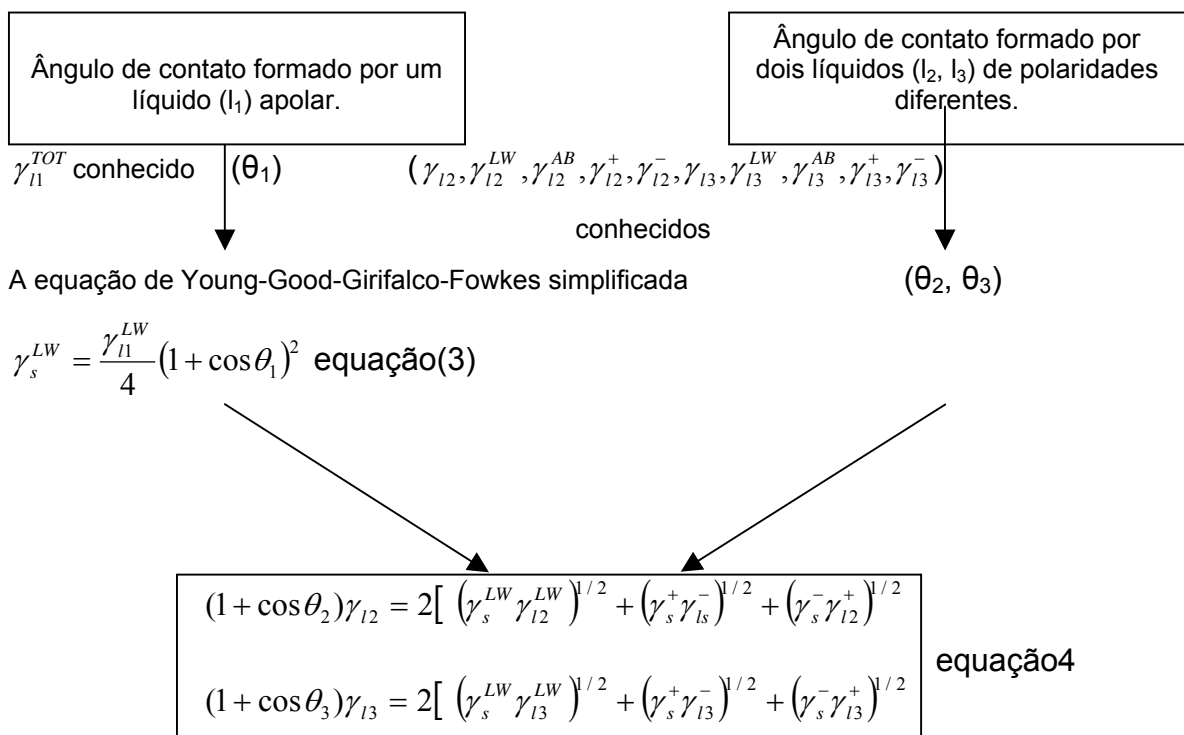
$$(1 - \cos \theta) \gamma_l = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula e portanto a equação 1 reduz-se a:

$$\gamma_s^{LW} = \frac{\gamma_l^{TOT}}{4} (1 + \cos \theta)^2 \quad \text{Equação 2}$$

Para se poder determinar as três componentes da tensão superficial de um sólido é necessário determinar-se o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes, de acordo com a metodologia seguinte:

Figura1: Metodologia usada no cálculo da tensão superficial de um sólido pela técnica de medição de ângulos de contato.



As componentes polares e apolares de alguns líquidos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Componentes da tensão superficial de líquidos a 25°C

Líquido	Tensão superficial (mJ/m ²)			
	γ_l^{TOT}	γ_l^{LW}	γ_l^+	γ_l^-
di-iodometano	50,8	50,8	0,0	0,0
α -bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
água	72,8	21,8	25,5	25,5
glicerol	64,0	34,0	3,92	57,4
formamida	58,0	39,0	2,28	39,6
decano	23,8	23,8	0,0	0,0

1.1. Tensão superficial determinada com água, formamida e α -bromonaftaleno

Com os valores dos ângulos de contato obtidos com formamida (θ_F), água (θ_W) e α -bromonaftaleno (θ_B), aplicando a equação 1 e com auxílio dos valores da Tabela 1 obtém-se o seguinte sistema de equações:

$$\begin{aligned} \gamma_s^{LW} &= 11,1(1 + \cos \theta_B)^2 \\ 5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} &= 36,4(1 + \cos \theta_W) - 15,55(1 + \cos \theta_B) \\ 6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} &= 29(1 + \cos \theta_F) - 20,806(1 + \cos \theta_B) \end{aligned}$$

ANEXOS

ANEXO 1: ARTIGO 1

Biofilmes Microbianos e resistência aos sanitizantes: uma revisão

Periódico: **Alimentos e Nutrição**.....57**ANEXO 2: ARTIGO 2**Factors involved in attachment of *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* to stainless steelPeriódico: **Food Microbiology**74**ANEXO 3: ARTIGO 3**Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to materials used in kitchen surfacesPeriódico: **Journal of Food Protection**.....92

Biofilmes Microbianos e resistência aos sanitizantes: uma revisão

**Kelly Mari Pires de OLIVEIRA^{1,2},
Tereza Cristina Rocha Moreira de OLIVEIRA²**

Biofilmes Microbianos e resistência aos sanitizantes: uma revisão

RESUMO

Os biofilmes são estruturas altamente organizadas nas quais microrganismos crescem e sobrevivem a ambientes hostis. São definidos como complexos ecossistemas microbianos embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) aderidos a uma superfície. Biofilmes podem ser formados e tornarem-se uma fonte constante de contaminação de alimentos se microrganismos não forem completamente removidos das superfícies de contato durante a desinfecção. Os microrganismos aderidos são mais resistentes aos sanitizantes que as células livres. Porém, a eficácia de um sanitizante depende do tipo de microrganismo, da natureza do sanitizante e da superfície de adesão. A compreensão de como os biofilmes podem ser formados é importante para a manutenção da qualidade e segurança dos alimentos. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão sobre a formação de biofilme e a sua resistência aos sanitizantes.

Palavras-chave: adesão, sanitizantes, EPS

Introdução

A vida microbiana na forma de células isoladas não é freqüente na natureza. Os microrganismos colonizam superfícies de tecidos dos organismos vivos ou superfícies de matéria inanimada, aderindo firmemente e formando comunidades denominadas de biofilmes, que podem atingir alto nível de complexidade.

Biofilme é um grupo de microrganismos associados entre si por seus produtos extracelulares, que funcionam como uma interface, aderido a uma superfície abiótica ou biótica. O início da formação do biofilme ocorre quando bactérias livres ou planctônicas reconhecem uma superfície e aderem-se a ela firmemente.¹⁷

Os biofilmes formam-se sobre uma grande variedade de superfícies tais como, dentes, epitélios, cateteres, plásticos, aço inoxidável entre outros. A acumulação em equipamentos industriais tem sido um problema constante. A presença de biofilme em superfícies de indústrias alimentícias pode resultar em um impacto negativo na qualidade dos produtos finais como também à corrosão microbiana dos maquinários. Além disso, os microrganismos quando em biofilmes na indústria de alimentos apresenta uma maior sua resistência aos sanitizantes.^{10, 27}

Os microrganismos aderidos às superfícies de processamento de alimentos oferecem problemas consideráveis em relação à contaminação cruzada e contaminação pós-processamento.^{16, 17, 32}

A monitorização de biofilmes, evitando a sua formação, melhora a qualidade e vida de prateleira dos alimentos, aumenta a vida de tubulações e equipamentos, diminui os custos de produção com a manutenção de equipamentos e pelo uso racional de sanitizantes, com conseqüente redução de impactos ambientais. Assim, este trabalho teve como objetivo fazer uma revisão sobre as etapas de formação de biofilme e à sua resistência aos sanitizantes.

Formação do Biofilme

A formação de biofilme é um processo dinâmico. Os modelos atuais, baseados em grande parte no estudo com *Pseudomonas* spp., descrevem a formação de biofilme como um processo linear, que começa quando células bacterianas planctônicas prendem-se a uma superfície. Essa adesão é seguida de multiplicação do microrganismo, desenvolvimento da estrutura do biofilme e dispersão de células bacterianas na superfície. Essas várias fases de interações microbianas com a superfície parecem requerer a produção de substância extracelular polimérica (EPS), que ajuda na adesão inicial e na manutenção da estrutura do biofilme.^{3,11,12,15}

A adesão é a primeira etapa no complexo processo de formação de um biofilme. O mecanismo mais aceito de adesão de bactérias em superfícies sólidas, descrito por Marshall em 1971, apresenta duas etapas, a adesão reversível e a adesão irreversível.¹⁵ O modelo proposto por Busscher & Weerkamp⁶ considera no processo a distância entre a bactéria e a superfície de adesão, que ocorrem em três etapas. Em ambos, o passo final depende da habilidade do microrganismo metabolizar e produzir material adesivo. O desenvolvimento do biofilme, descrito por Hamilton e Characklis apud Morton et al.²⁵ envolve quatro etapas para o desenvolvimento do biofilme. Primeiramente ocorre o transporte de moléculas orgânicas e células para a superfície, em seguida a adsorção dessas moléculas orgânicas para formar um "condicionamento da superfície", e somente na terceira etapa ocorrerá a adsorção de células à superfície condicionada e o crescimento de células com a síntese de EPS. À medida que vem sendo estudado o desenvolvimento do biofilme novas etapas vem sendo descritas no processo de formação.

Levando em consideração os modelos descritos na literatura, a formação do biofilme ocorre nas seguintes etapas: (1) Transporte de moléculas orgânicas para a superfície e adsorção para a formação do filme condicionador; (2) Transporte de microrganismos e outras partículas para a superfície condicionada; (3) Adesão reversível à superfície; (4) Adesão entre os microrganismos aderidos; (5) Adesão irreversível das células, com produção de EPS; (6) Multiplicação das células e crescimento do biofilme; (7) Transporte de subprodutos do biofilme para o exterior; (8) Desprendimento do biofilme.

Composição do Biofilme

O biofilme é composto por aproximadamente 97% de água. Esta porcentagem varia dependendo das características ambientais onde o biofilme se encontra. Segundo Sutherland ³⁰, além da água e das células microbianas, a matriz do biofilme é composta de um complexo de polímeros, nutrientes absorvidos e metabólitos, produtos de lise celular e partículas de materiais do meio onde se encontra (Tabela I).

Estudos recentes mostraram que os biofilmes na natureza são heterogêneos. Os microrganismos presentes podem exibir diferentes propriedades fisiológicas e metabólicas. Bactérias anaeróbias e aeróbias podem ser isoladas do mesmo biofilme. Por exemplo, *P. aeruginosa* tende a ser encontrada no interior do biofilme e *V. parahaemolyticus* escolhe estar perto da interface do biofilme-líquido. A interdependência metabólica pode acontecer entre espécies presentes ^{11, 29, 15} e muitos patógenos humanos potenciais como *Listeria pneumophila*, *Cryptosporidium* spp, *Mycobacterium* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp, Rotavirus, Giardia, micoplasmas e protozoários podem se associar e formar biofilmes. ^{20, 25}

Tabela I. Composição dos Biofilmes

Componentes	% na matriz
Água	Acima de 97%
Células microbianas	2-5% (várias espécies)
Polissacarídeos (homo e hetero-polissacarídeos)	1-2% (neutro e polianiónico)
Proteínas (extracelulares e resultante de lise)	<1-2% (várias, incluindo enzimas)
DNA e RNA	< 1-2% (de lise de células)
Íons	? (ligados ou livres)

Fonte: Sutherland ³⁰

Condicionamento da Superfície

O primeiro estágio na formação do biofilme está relacionado com o meio onde o microrganismo se encontra, pois serão componentes deste meio que irão adsorver a superfície e formar o filme condicionador. Por exemplo, o filme condicionador em laticínios será o leite, em abatedouros proteínas e gorduras da carne, nos dentes a saliva e será em sistema de abastecimento de água a própria água.

O filme condicionador provavelmente altera as propriedades físico-químicas da superfície. Barnes et al. ⁴ estudaram a adesão de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* no aço condicionado com leite e com as proteínas do leite e observaram uma menor adesão no aço condicionado com leite comparado ao aço

condicionado com água. Resultados similares foram encontrados por Helke et al.¹³ e Speers & Gilmour²⁸. Cunliffe et al.⁷ estudaram os efeitos físico-químicos das superfícies condicionadas com diferentes substâncias e encontraram uma menor adesão quando a superfície foi condicionada com grupamentos hidrofílicos. Flint et al.⁸ também encontraram uma menor adesão quando trataram uma superfície com soluções alcalinas. Assim, a aderência microbiana poderá ser alterada através das alterações das cargas de superfície pelo uso de diferentes soluções como os sanitizantes.

Normalmente, moléculas do meio são responsáveis pelo condicionamento, contudo certos microrganismos também são capazes de condicionar a superfície. Sasahara & Zottola²⁶ observaram que *Listeria monocytogenes* mostrou aderência ao vidro significativamente maior quando crescia juntamente com *Pseudomonas fragi*. Os autores concluíram que *P. fragi* pode colonizar primeiro e a EPS produzida por este microrganismo ser a responsável pelo aumento da adesão de *L. monocytogenes*.

Adesão Reversível e Irreversível

O segundo passo na formação do Biofilme é a aderência do microrganismo à superfície condicionada. Este processo pode ser ativo ou passivo e depende da motilidade bacteriana ou do transporte das células planctônicas por gravidade, difusão ou forças dinâmicas do fluido onde se encontram.¹⁹ Os mecanismos envolvidos na adesão inicial são dependentes não só das propriedades físico-químicas da superfície bacteriana, mas também da composição da superfície de adesão, como a natureza eletroquímica e hidrofobicidade relativa, da rugosidade e do filme condicionador. Para acontecer, deve haver forças atraentes entre a célula e

a superfície. Essas forças de atração devem ser grandes o suficiente para superar qualquer força repulsiva. Forças de longo alcance e interações de alcance limitado podem ter um papel significativo em adesão.^{14, 15}

Inicialmente, as interações entre bactéria e substrato levam a uma adesão reversível. Durante este estágio várias forças de longo alcance estão envolvidas como forças de van der *Waals*, forças da dupla camada elétrica e interações hidrofóbicas. Nesse estágio a bactéria ainda mostra movimentos *Brownianos* que podem removê-la por forças exercidas pelo fluido. Para ocorrer adesão irreversível o microrganismo deve ultrapassar as forças repulsivas, utilizando apêndices especiais como flagelo, fímbrias, pili e exopolissacarídeos. Na adesão irreversível várias forças de curto alcance estão envolvidas como interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, iônicas e covalentes e interações hidrofóbicas.¹⁹ É bastante difícil determinar quais são as forças ou interações mais importantes para a aderência.

Embora a motilidade ajude na colonização dos microrganismos Gram-negativos, não é uma condição prévia para formação do biofilme, pois várias bactérias que não apresentam motilidade como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, e *Mycobacteria* formam biofilmes rapidamente. Woodward et al.³² estudaram o envolvimento da fímbria SEF14 e SEF17 na adesão de *Salmonella* Enteritidis e encontraram que em cepas mutantes, sem fímbrias, a adesão foi reduzida em 90% quando comparada com cepas que possuíam fímbrias. Em estudo realizado com adesão de *Staphylococcus epidermidis* em modelos animais, proteínas e adesinas polissacarídicas foram relacionadas à aderência.¹¹ MORTON et al.²⁵ concluíram que a adesão em ambientes naturais e indústrias é mediada por EPS, produzidas pelas próprias células.

Produção de Substância Extracelular Polimérica

A EPS é constituída de polissacarídeos, ácidos nucléicos e proteínas que servem de união entre as microcolônias que formam o biofilme. EPS é também denominada de matriz extracelular, “substâncias polímeras“, “polissacarídeos extracelulares” e “substância extracelular polimérica”.

O termo glicocálice, cápsula ou camada limosa em muitos casos também se referem a EPS. A EPS produzida pelos microrganismos é importante na adesão inicial do microrganismo, bem como em sua permanência, por protegerem as células da desidratação e auxiliarem na captura de nutrientes. A EPS conserva e concentra enzimas digestivas liberadas pelas bactérias, aumentando assim a eficiência metabólica das células. Constitui uma barreira física e protege da ação de agentes antibacterianos.^{5, 16, 23, 25}

A composição química da EPS é específica de cada cepa. O polímero polissacarídeo alginato, produzido por *P. aeruginosa* é o componente melhor estudado de biofilme e parece ter um papel importante na estrutura do biofilme, determinando a complexidade estrutural em forma de cogumelo.¹¹ Em biofilmes orais, as bactérias são capazes de sintetizar dextranos e levanos utilizando a sacarose da alimentação como substrato.³⁰ *V. cholerae* produz EPS rica em galactose e glicose. A composição da EPS excretada também pode variar conforme varia a composição do meio.

Ainda não ficou estabelecido se os ácidos nucléicos e as proteínas encontradas na EPS têm um papel estrutural ou somente são resíduos da lise celular. O DNA extracelular parece ter importância na estrutura, pois quando os biofilmes jovens (<60 h) são expostos a DNase ocorre o rompimento de microcolônias. A utilização de enzimas poderia ser útil na limpeza de superfícies pela

possibilidade de remoção ou desestabilização dos biofilmes devido à alteração das propriedades da EPS.¹¹

Embora os polissacarídeos sejam os componentes mais estudados e caracterizados da EPS, os dados disponíveis sugerem que a EPS produzida por diferentes espécies microbianas em condições de crescimento diversas, apresenta grande diversidade em relação à sua constituição. A dificuldade encontrada na caracterização química da EPS se deve a problemas encontrados durante a separação e extração da EPS de células bacterianas e à complexidade da análise de polissacarídeos altamente ramificados e com uma grande variedade de acoplamentos.¹¹

Crescimento, Desenvolvimento e Desprendimento do biofilme

Após a adesão irreversível, as células crescem e se multiplicam utilizando os nutrientes presentes no filme condicionador e no fluido que as envolve. Durante este período as células também produzem EPS, a qual auxilia na ancoragem das células à superfície. Estudos atuais sugerem que EPS de alto peso molecular não age diretamente como adesina. Outros fatores, possivelmente polissacarídeos de baixo peso molecular, medeiam o processo de colonização inicial seguida da ação de EPS de peso molecular mais alto.^{11, 15, 20}

O desenvolvimento do biofilme acontece através de vários mecanismos, podendo ocorrer pela redistribuição de células aderidas na superfície e pela motilidade dos microrganismos na própria superfície. Fatores ambientais, como troca do substrato do meio, também alteram o desenvolvimento do biofilme. Applegate & Bryers² observaram que quando havia baixa disponibilidade de oxigênio e carbono ocorria mudança no biofilme e a troca de substrato fazia com as células se

desprendessem da superfície. O crescimento do biofilme resulta da divisão dos microrganismos, as células filhas se espalham formando um agrupamento de células de maneira semelhante à formação de colônia em placas de ágar. Esse tipo de crescimento foi monitorado microscopicamente e foi possível medir a expansão radial de microcolônias de *Mycobacterium fortuitum* em uma superfície de silicone.¹¹

Em uma superfície com grande quantidade de bactérias densamente condensadas, o crescimento pode ser prejudicado, com posterior morte celular, devido à incapacidade de obtenção de nutrientes e ou pelo acúmulo de metabólitos tóxicos liberados. Entretanto, isso não acontece, pois os biofilmes são estruturas altamente organizadas. As células bacterianas produzem moléculas sinalizadoras, também denominadas *quorum-sensing*, que permitem a comunicação entre elas, e dessa forma possibilitando, que as bactérias cresçam e sobrevivam em ambientes hostis.

Os processos de rompimento do biofilme acontecem a qualquer hora durante o desenvolvimento, resultando na liberação e ressuspensão dos microrganismos do biofilme para a fase planctônica (livre) do sistema^{20, 25} e posterior disseminação do biofilme.

Resistência aos sanitizantes

Biofilmes podem ser uma fonte de contaminação permanente dos alimentos, uma vez que não podem ser removidos durante o procedimento de limpeza de plantas de processamento de alimentos.¹⁷

Vários estudos mostraram que microrganismos estabilizados em um biofilme apresentam maior resistência ao tratamento por sanitizantes do que as células planctônicas em suspensão.^{1, 17, 19, 22, 25, 27, 31} Esta resistência tem sido atribuída a

diversas propriedades que afetam a atividade do sanitizante, incluindo temperatura, pH, presença de matéria orgânica ²⁵, fatores relacionados com o microrganismo como quantidade de nutrientes, fase de crescimento e sensibilidade ao sanitizante. Além disso, fatores relacionados com o biofilme, que levam à diminuição da difusão do sanitizante na matriz de EPS ou a presença de enzimas que degradam substâncias antimicrobianas podem também afetar a resistência. ¹⁹

Algumas revisões que descrevem os mecanismos de proteção da EPS à ação dos sanitizantes sugerem que esta ação não está relacionada somente com a constituição química do agente antimicrobiano em questão. É importante também outros fatores, como absorção do agente antimicrobiano pelos microrganismos presentes na superfície do biofilme. ³¹

A eficácia dos sanitizantes na redução de bactérias aderidas depende do tipo de microrganismo, da natureza do sanitizante e da superfície de adesão. O uso de misturas de sanitizantes pode auxiliar no controle das bactérias aderidas. ^{25, 27} Gândara & Oliveira ⁹ estudaram os efeitos da higienização e remoção do *Streptococcus thermophilus* do aço e encontraram que para melhorar a eficiência da limpeza foram necessárias diferentes etapas de limpeza e tipos de detergentes. O uso de detergentes e enxágüe com água a baixa pressão pode remover ou desestabilizar o material extracelular que envolve a população aderida, reduzindo a área coberta por EPS, mas pode não afetar o número de células viáveis. ¹⁰

Salmonella e *L. monocytogenes* quando aderidas são mais resistentes aos sanitizantes em relação às células planctônicas. ^{17, 21, 27} Os agentes sanificantes de uso comum precisam ser usados em concentrações 5 a 10 vezes maiores que as utilizadas para a desinfecção de bactérias livres. ^{15, 18, 24, 31} Isso foi constatado por Luppens et al. ²² que observaram a necessidade do uso de concentração 50 e 600

vezes maior de cloreto de benzalcônio e hipoclorito de sódio, respectivamente, para a destruição de *S. aureus* em biofilme quando comparado com os microrganismos em suspensão.

A maior resistência aos sanitizantes observada muitas vezes nas bactérias Gram negativas é atribuída à membrana externa, que atua como uma barreira à entrada de sanitizantes.²⁵ Como alguns biofilmes são compostos por diferentes bactérias Gram positivas e Gram negativas, o estudo da composição do biofilme pode facilitar a escolha de um produto efetivo ou indicar o uso de combinações de detergentes.¹⁰

Embora os microrganismos aderidos se mostrem mais resistentes que células livres aos sanitizantes, não significa que o trabalho para reduzir a presença de células livres não seja essencial. Além disso, a eficácia dos sanitizantes é reduzida pela presença de matéria orgânica, portanto é necessário uma limpeza adequada para remoção de sujidades e células aderidas antes da aplicação do sanitizante. Outro fator importante é testar anteriormente a eficácia dos sanitizantes sobre microrganismos aderidos. Em alguns casos é necessária alteração no protocolo de limpeza e sanitização, visando o controle da contaminação por biofilmes.

Conclusão

Biofilmes podem ser uma fonte constante de contaminação de alimentos, ter um impacto negativo na qualidade dos produtos finais e causar corrosão dos equipamentos. Por esta razão é importante que em um protocolo de limpeza e desinfecção na indústria de alimentos a presença de biofilme seja sempre considerada e a sua remoção realizada o mais cedo possível. Alguns autores sugerem diferentes etapas e tipos de detergentes e sanitizantes, além de um

aumento do tempo destinado à fase de limpeza para uma eficaz remoção de células aderidas. Esses cuidados e o monitoramento do ambiente de processamento de alimentos são essências para evitar os vários problemas associados à formação de biofilmes.

Abstract

Microbial Biofilm and resistance to sanitizers: a review

Biofilms are structures highly organized in which microorganisms grow and therefore can survive to hostile environments. They are defined as complex community of microorganisms usually encased in an extracellular matrix of polymeric substances (EPS) attached to a surface. Biofilms can be formed and be constant sources of product contaminations if poor cleaning and disinfection practices do not remove microorganisms from food processing surfaces. The cells embedded in biofilm are more resistant to sanitizers than free cells. However, the sanitizers' effectiveness depend on the type of microorganism, the type of sanitizer and the surface attachment. The understanding of biofilms formation is important for food quality and safety. The aim of this study was to review biofilms formation and its resistance to sanitizers.

Keywords: adhesion, EPS, sanitizer

Referências bibliográficas

- [1] AANTREKKER, E. D. den; BOOM, R. M.; ZWIETERING, M. H.; van SCHOTHORST, M. Quantifying recontamination through factory environments – a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v.80, p.117-130, 2003.
- [2] APPLGATE, B. and BRYERS, J. D. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. **Biotechnol. Bioeng.**, v.37, p.17-25, 1991.
- [3] AZEREDO, J. C. V. R. **Adesão de microrganismos e composição da matriz de bioagregados**. Braga. 1998, 231p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Portugal, 1988.
- [4] BARNERS, L.-M.; LO, M. F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, A. H. L. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.4543-4548, 1999.
- [5] BLACK, J. G. **Microbiologia**, Fundamentos e Perspectivas, 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002. 829 p.
- [6] BUSSCHER, H. J. and WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interaction in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiol.**, v.46, p.165-173, 1987.
- [7] CUNLIFFE, D.; SAMART C. A.; ALEXANDER C.; VULFSON, E.N. Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.4995-5002, 1999.
- [8] FLINT, S. H.; BROOKS, J. D.; BREMER, P. J. Properties of stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **J. Food Eng.**, v.43, p.235-242, 2000.
- [9] GÂNDARA, A. L. N. & OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de ao inoxidável e feitos da higienização na sua remoção. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.20, n.1, 2000.
- [10] 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. **J. Appl. Microbiol.**, v.87, p.41-48, 1999.
- [11] HALL-STOODLEY, L. and STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.13, p.228-233, 2002.

- [12] HAYASHI, H.; TSUNEDA, S.; HIRATA, A.; SASAKI, H. Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesion behaviors in terms of DLVO theory. **Coll. Surf. B: Bioint.**, v.22, p.149-157, 2001.
- [13] HELKE, D. M.; SOMERS, E. B.; WONG, A. C. L. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. **J. Food Prot.**, v.56, p.479-484, 1993.
- [14] HENRIQUES, M.; GASPARETTO, K.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. **Biotechnol. Lett.**, v.24, p.1111-1115, 2002.
- [15] HOOD, S.K. and ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Contr.**, v.6, n° 1, p.9-18, 1995.
- [16] HOOD, S. K. and ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by food borne microorganisms during growth in model food systems. **Int. J. Food Microbiol.**, v.37, p.145-153, 1997.
- [17] JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **Int. J. Food Microbiol.**, v.64, p.367-372, 2001.
- [18] KRYSINSKI, E. P.; BROWN, L. J.; MARCHISELLO, T. J. Effect of cleans and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **J. Food Prot.**, v.55, p.246-25, 1992.
- [19] KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v.42, p.9-27, 1998.
- [20] KUSUMANINGRUM, H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v.85, p.227-236, 2003.
- [21] LIAO, CHIHG-HSING; SAPERS, G. M. Attachment and growth of *Salmonella* Chester on apple fruits and I vivo response of attached bacteria to sanitizer treatments. **J. Food Prot.**, v.63, n.7, p.876-883, 2000.
- [22] LUPPENS, S. B. I.; REIJ, M. W.; van der HEIJDEN, R. W. L.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.4194-4200, 2002.

[23] MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de BLOCK**, 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

[24] MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropilene and rubber surfaces after short contact times. **J. Food Prot.**, v.53, p.742-746, 1990.

[25] MORTON, L. G. H.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARD, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v.41, p.247-259. 1998.

[26] SASAHARA, K. C.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **J. Food Prot.**, v.56, p.1022-1028, 1993.

[27] SINDE, E. and CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiol.**, v.17, p.439–447, 2000.

[28] SPEERS, J. G. S.; GILMOUR, A. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. **J. Appl. Bacteriol.**, v.59, p.325-332, 1985.

[29] STEELE, A.; GODDARD, D.T. & BEECH, I.B. An Atomic Force Microscopy Study of the Biodeterioration of Stainless Steel in the Presence of Bacterial Biofilms. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, p 35-46, 1994.

[30] SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **TRENDS Microbiol.**, v.9, n.5, p.222-227, 2001.

[31] VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v.49, p.259-270, 2002.

[32] WOODWARD, M. J.; SOIKA, M.; SPRIGINGS, K. A.; HUMPREY, T. J. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.481-487, 2000.

**Factors involved in attachment of *Salmonella* Enteritidis,
Pseudomonas aeruginosa and *Serratia marcescens* to stainless steel.**

Kelly Oliveira³, Tereza Oliveira¹, Pilar Teixeira², Joana Azeredo and Rosário Oliveira^{2*}

1Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, C.P. 6001, CEP:87051-970, Londrina, PR, Brasil.

2Centro de Engenharia Biológica - CEB, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

3Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR, Brasil

*Corresponding author:

Prof. Rosário Oliveira

Centro de Engenharia Biológica

Universidade do Minho, Campus de Gualtar

4710 - 057 Braga

Portugal

tel: 351 253604409

fax: 351 253678986

e-mail: roliveira@deb.uminho.pt

Running headline: Attachment of bacteria to stainless steel

Abstract

Adhesion of microorganisms to food processing equipment surfaces and the problems it causes are a matter of strong concern to the food industry. Contaminated food processing surfaces may act as potential sources of transmission of pathogens in food industry, catering and in the domestic environments. The mechanisms governing microbial adhesion to surfaces are poorly understood; several studies have shown that adhesion of bacteria partly depends upon the nature of the inert surfaces and partly upon the bacterial surface properties. The aim of this study was to evaluate the effect of surface hydrophobicity in the adhesion of four different strains of *Salmonella* Enteritidis, one *Pseudomonas aeruginosa* and one *Serratia marcescens* to stainless steel 304 (SS304). Hydrophobicity was evaluated through contact angle measurements using the sessile drop method. All the strains studied showed positive values of the degree of hydrophobicity (ΔG_{owl}), and so can be considered hydrophilic. *P. aeruginosa* was the less hydrophilic microorganism and stainless steel revealed a hydrophobic character. The XPS results corroborated the similarity of the values of the degree of hydrophobicity obtained by contact angles. The different *Salmonella* strains showed similar cell wall compositions and cell surface physico-chemical properties. Nevertheless, *P. aeruginosa* and *S. Enteritidis* MUSC presented higher adhesion ability to SS304 ($p < 0.05$), which can be explained by a facilitated interaction between their higher acceptor electron capacity with the single donor ability of SS304.

Keywords: Adhesion; *Salmonella* Enteritidis; stainless steel; hydrophobicity, contact angle; XPS.

1. Introduction

Adhesion of microorganisms to food processing equipment surfaces is of great concern to the food industry. Adhered microorganisms to solid surfaces can have the potential to act as a chronic source of microbial contamination, which may compromise food quality and represent a significant health hazard (Barnes, et al., 1999). Contaminated food processing surfaces may act as a potential source of transmission of pathogens in food industry, catering and in the domestic environments. Several studies showed that cross-contamination can result from hands, sponges/clothes and utensils either in domestic kitchens or in any food processing plant (Hilton and Austin, 2000; Gorman et al., 2002; Kusumaningrum et al., 2002; Kusumaningrum et al., 2003). For instance, *Salmonella* spp. is able to colonize different inert food contact surfaces to form biofilms (Hood and Zottola, 1997; Gough and Dodd, 1998; Bonafonte et al., 2000; Joseph et al., 2001). So, it has been recognized that a greater understanding of the interaction between microorganisms and food-processing surfaces is required to control these problems.

Salmonellosis has been one of the most commonly reported food-borne illnesses worldwide. In many countries, including Brazil, *Salmonella* Enteritidis is the most frequently isolated serotype. Epidemiological evidence has linked the majority of outbreaks in State of Paraná, Brazil, to contaminated poultry products.

Pseudomonas species are often associated with spoilage of perishable foods stored at refrigerator temperatures such as milk and meats and, therefore, have a major impact on the quality of these foods (Hood and Zottola, 1997; Eneroth et al., 2000). *Serratia marcescens* is an opportunistic pathogen widely distributed in nature, including foods of vegetable and animal origin. Contaminated foods can act as a vehicle of infection and in humans *Serratia marcescens* may cause diarrhea, septic arthritis, urinary tract infections, wound infections and septicemia (Singh et al., 1997; Gran et al., 2003).

Stainless steel has been the material of choice for working surfaces and kitchen sinks for many years because of its mechanical strength, corrosion resistance, longevity and ease of fabrication (Holah and Thorpe, 1990). In the food processing industry most of the surfaces are of stainless steel including, pipelines tanks (Assanta et al., 2002), machinery and working surfaces (Hood and Zottola, 1997; Rossoni and Gaylarde, 2000; Parker et al., 2001). Moreover, it is relatively resistant to chemical attack by oxidizing and other sanitizing agents used in the food industry, like hypochlorite, peracetic acid and iodophors (Boulangé-Peterson, 1996).

The mechanisms governing the adhesion of *Salmonella* spp., *Pseudomonas* and *Serratia* adherence to inert surfaces are poorly studied; several studies have shown that adhesion of bacteria partly depends upon the nature of the inert surfaces and partly upon the bacterial surface properties (Sinde and Carballo, 2000). Hydrophobicity and surface charge are the most important surface properties in the adhesion process. Innumerable studies have demonstrated this fact (van Loosdrecht et al., 1987; Millsap et al., 1996; Hood and Zottola, 1997; Teixeira and Oliveira, 1999; Pereira et al., 2000).

The understanding of microbial adhesion is of major importance in preventing undesirable biofilm formation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of surface hydrophobicity in the adhesion of *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* to stainless steel 304 (SS304), in order to investigate the behavior of different strains of the same species and among species.

2. Materials and methods

2.1 Media and growth conditions

The strains used in this study are presented in Table 1.

Table 1

Bacterial isolates used in this study.

Strains	Source
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹	Clinical human sample
<i>Serratia marcescens</i> ¹	Clinical human sample
<i>Salmonella Enteritidis</i> EMB ²	Water from poultry packaging
<i>Salmonella Enteritidis</i> MUSC ²	Breast meat of poultry
<i>Salmonella Enteritidis</i> AL ³	Food sample related to food-borne outbreak
<i>Salmonella Enteritidis</i> PC ³	Fecal human sample

The bacterial isolates were obtained from:

¹Clinical Microbiology Laboratory, Depart. of Clinical Analysis, University of Maringá, Pr, Brazil.

²Food Microbiology Lab., Depart. of Food and Dry Technology, University of Londrina, Pr, Brazil.

³ LACEN (Central Paraná Public Health Laboratory Service).

All bacterial isolates were maintained in trypticase soy agar (TSA). Every strain was subcultured twice in trypticase soy broth (TSB) at 37°C in an orbital shaker (130 rpm), overnight. The cells were then harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min and washed three times with phosphate buffered saline (PBS 0.1M pH 7). The pellets were resuspended in PBS to an inoculum level of 10⁸ CFU/ml, determined by optical density.

2.2 Material used as substratum

The test surface was stainless steel (304, finish no 4), commonly present in the food industry and used in domestic kitchens. The coupons were cut in 0.8 x 0.8 cm, washed in a solution of a commercial detergent (Sonasol Pril, Henkel Ibérica S.A., Portugal) in ultrapure water for 30 min and then thoroughly rinsed in ultrapure water (to remove any remaining detergent), followed by immersion in ethanol 90 % for 30 min to completely degrease the surface.

2.3 Hydrophobicity and surface free energy

Hydrophobicity was evaluated through contact angle measurements and using the approach of van Oss and co-workers (van Oss et al., 1987, 1988, 1989). Accordingly, the degree of hydrophobicity of a given entity is expressed as the variation of the surface free energy between two moieties of that entity when immersed in water, comprising two components: one apolar, due to Lifshitz-van der Waals interactions (γ^{LW}) and one polar resulting from Lewis acid-base interactions (γ^{AB}). The latter comprising two parameters, γ^- expressing the electron donor capacity and γ^+ accounting for electron acceptance.

Contact angle measurements (at least 25 determinations with each liquid on stainless steel and on each microbial strain) were performed automatically with the aid of an image analysis system (G2/G40) installed in a standard contact angle apparatus (Kruss-GmbH). The images were transmitted by a video camera to a personal computer for evaluation. All the measurements were performed at room temperature. In the case of bacterial cells, the measurements were performed on a cell lawn using the sessile drop method described by Busscher et al. (1984). Briefly, bacteria were deposited on a 0.45 μm cellulose acetate membrane filter by filtration of the suspension using negative pressure. To standardize the moisture content, the filters were then transferred onto Petri dishes containing 1% (w/v) agar with 10% (v/v) glycerol. Measurements of advancing water contact angles were carried out at 25°C and three liquids with different polarities were used, water (W), formamide (F) and α -bromonaphtalene (α -B).

Hydrophobicity of the stainless steel was estimated by the same technique, with direct measurements of contact angles on stainless steel surface, after degreasing and cleaning.

2.4 X-ray photoelectron spectroscopy

Bacterial cell surface composition was measured using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The bacterial cells were grown in 200 ml TSB at 37 °C under 120 rpm for 18 h and washed three times in deionized water by centrifugation (10 min at 5000 g and 4 °C). A volume of 200 ml of a cellular suspension (10^9 cells/ml) was vacuum filtered through an acetate cellulose membrane of 45 µm. The membrane, completely covered with cells, was immediately frozen with liquid nitrogen and then stored at -80 °C until the subsequent step of lyophilization. Freeze drying was performed at 10 Pa, overnight. The samples were placed in a dessicator, at room temperature and immediately analyzed by XPS. The XPS analysis was performed using an apparatus ESCALAB 200A, with a VG5250 software and data analysis. The spectrometer used monochromatized Mg K α X-ray radiation (15.000 eV). The constant pass energy of the analyzer was 20 eV and it was calibrated with reference to Ag 3d $_{5/2}$ (368.27 eV). The pressure during analysis was under 1×10^{-6} Pa. The spectra were recorded following the sequence C 1s, O 1s, N 1s, P 2p. The chemical composition was defined as the ratio between oxygen and carbon (O/C), nitrogen and carbon (N/C) or phosphorous and carbon (P/C).

2.5 Adhesion assays

The coupons of stainless steel were immersed in 2 ml of each bacterial suspension containing 10^8 CFU/ml. After 1 h at 37°C with constant shaking at 100 rpm, the coupons were rinsed twice with PBS to remove poorly adhered bacteria. An aliquot of 20 µl/ml of a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution was added to each well containing the plates and incubated for 30 min in the dark. After this time, the wells were rinsed with sterile distilled water and the adherent microorganisms were quantified by automatic enumeration using epifluorescence microscopy. Thirty fields per coupon were scanned and the fluorescent cells

were enumerated. Computerized image analysis software (Image-Pro Plus, Media Cybernetics) was used for the quantitative estimation of the adherent cells. All experiments were done in triplicate.

2.6 Statistical analysis

The resulting data were analysed using SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences). One-way ANOVA with Bonferroni test was used to compare the number of adhered cells. All tests were performed with a confidence level of 95%.

3. Results and discussion

The contact angles formed by the three liquids (water, formamide, and α -bromonaphthalene) on bacterial lawns are present in Table 2. The values of water contact angles for all the strains assayed were heterogeneous ranging from 9.7° to 33.5° . *P. aeruginosa* displayed the greatest water contact angle (33.5°). The water contact angles of all *Salmonella* strains tested were quite similar ($9.7^\circ - 10.8^\circ$) and were somewhat lower than those reported in the literature ($17^\circ - 35^\circ$) (Dickson and Koohmaraie, 1989; Sindi and Carballo, 2000). The different serovars of *Salmonella* studied and the non-uniformity on bacterial surface may explain the results obtained in this study (Donlon and Colleran, 1993). The water contact angle value gives preliminary information about the degree of hydrophobicity of cells. The sample is considered hydrophobic or hydrophilic if the angle is higher or lower than 65° , respectively (Vogler 1998).

Table 2

Values of contact angles (in degrees) measured with water (θ_w), formamide (θ_f) and α - bromonaphatylene ($\theta_{\alpha-B}$) on the different microorganisms assayed.

	Contact angle (°) (\pm SD)		
	θ_w	θ_f	$\theta_{\alpha-B}$
<i>S. Enteritidis</i> EMB	10.8 (\pm 2.2)	15.6 (\pm 1.8)	26.1 (\pm 4.2)
<i>S. Enteritidis</i> MUSC	13.5 (\pm 1.6)	15.9 (\pm 2.3)	27.6 (\pm 1.7)
<i>S. Enteritidis</i> PC	14.0 (\pm 4.4)	17.0 (\pm 3.2)	31.7 (\pm 28)
<i>S. Enteritidis</i> AL	9.7 (\pm 1.9)	14.8 (\pm 2.6)	27.2 (\pm 2.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33.5 (\pm 3.9)	29.3 (\pm 2.7)	32.2 (\pm 2.5)
<i>Serratia marcescens</i>	19.1 (\pm 2.8)	25.7 (\pm 1.3)	37.2 (\pm 1.3)

SD means standard deviation

The values of the contact angles of the three liquids were used to calculate cell surface tension parameters and the degree of hydrophobicity (Table 3). The degree of hydrophobicity of a given material (l) can be defined in terms of the variation of the free energy of interaction between two entities of this material when immersed in water (w), ΔG_{lwl} . If the interaction between the two entities is stronger than the interaction of each entity with water ($\Delta G_{lwl} < 0$) the material is considered hydrophobic. On the contrary, if $\Delta G_{lwl} > 0$ the material is hydrophilic.

As far as hydrophobicity is concerned, all strains studied showed positive values of ΔG_{lwl} , and so can be considered hydrophilic, which is in accordance with the water contact angle values. The ΔG_{lwl} values were very similar, with the exception of *P. aeruginosa*, which exhibited a lower degree of hydrophilicity. It has been previously shown that, generally,

microorganisms adhere in higher numbers to hydrophobic materials (Sinde and Carballo, 2000; Cunliffe et al., 1999).

Table 3

Values of the components of surface tension (γ^+ , γ^- , γ^{LW}) and degree of hydrophobicity (ΔG_{lwl}) of bacterial cells.

Cells	Surface tension (mJ/m ²)			ΔG_{lwl}
	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
<i>S. Enteritidis EMB</i>	39.89	0.97	55.99	34.12
<i>S. Enteritidis MUSC</i>	26.00	4.6	51.30	31.70
<i>S. Enteritidis PC</i>	38.06	1.22	54.48	32.28
<i>S. Enteritidis AL</i>	39.50	1.05	55.84	33.79
<i>P. aeruginosa</i>				19.89
	20.03	8.03	53.31	
<i>S. marcescens</i>				36.18
	35.87	1.02	56.30	

γ^{LW} represents the apolar Lifshitz-van der Waals surface free energy component; γ^+ represents the electron acceptor parameter and γ^- represents the electron donor parameter of the polar Lewis acid-base surface free energy component; ΔG_{lwl} represents the degree of hydrophobicity

From Table 3, it can be observed that all strains had surfaces that were predominantly electron donors (higher values of γ^-), with a low electron acceptor parameter (γ^+). The exceptions were strains *S. Enteritidis MUSC* ($\gamma^+ = 4.61$) and *P. aeruginosa* ($\gamma^+ = 8.03$) that had the greatest electron acceptor parameters, which suggest that these cells are more prone to establish Lewis acid-base interactions by acceptance of electrons than the others.

Substrate surface physico-chemical characteristics are presented in Table 4. Considering the values of the contact angle of water on SS 304 obtained in this study (81.2°) and $\Delta G_{lwl} < 0$ (-59.8), the stainless steel assayed was hydrophobic, which is in accordance with several authors (Sinde and Carballo, 2000; Flint et al. 2000; Teixeira et al. 2005). A point to be noted is that stainless steel does not have an electron acceptor parameter but only an electron-donor (γ^-).

Table 4

Contact angle (in degrees) measured with water (θ_w), formamide (θ_f) and α -bromonaphthalene ($\theta_{\alpha-B}$) and values of the surface tension components (γ^+ , γ^- , γ^{LW}) and degree of hydrophobicity (ΔG_{lwl}) of stainless steel 304.

Surface	Contact angle (°) (\pm SD)			Surface tension (mJ/m ²)			
	θ_w	θ_f	$\theta_{\alpha-B}$	γ^{LW}	γ^+	γ^-	ΔG_{lwl}
Stainless steel	81.2 (\pm 0.9)	60.0 (\pm 1.1)	23.4 (\pm 0.46)	40.81	0.00	5.84	-59.80

SD means standard deviation

The XPS spectra of the bacterial surfaces showed that the most abundant elements on the surface are (C) carbon, oxygen (O), and nitrogen (N) along with outline amounts of phosphorus (P). The chemical composition of microbial cells surface is usually expressed in terms of N/C, O/C and P/C ratios (Van der Mei et al., 2000). The corresponding values for the microorganisms assayed are presented in Table 5. All strains used in this study exhibited high O/C values, ranging from 0.453 (*P. aeruginosa*) to 0.739 (*S. marcescens*), and P/C values, ranging from 0.004 (*S. marcescens*) to 0.025 (*P. aeruginosa*). The results for *P. aeruginosa*

are in accordance with Bruinsma et al. (2001), while for *S. marcescens* the present results are slightly inferior, probably due to strain characteristics.

Table 5

Ratios of the major chemical elements of bacterial surface composition of Salmonella strains, *P. aeruginosa* and *S. marcescens* obtained by XPS analysis.

Strain	N/C	O/C	P/C
<i>S. Enteritidis EMB</i>	0.066	0.584	0.008
<i>S. Enteritidis MUSC</i>	0.118	0.465	0.009
<i>S. Enteritidis PC</i>	0.118	0.466	0.009
<i>S. Enteritidis AL</i>	0.114	0.479	0.008
<i>S. marcescens</i>	0.119	0.739	0.004
<i>P. aeruginosa</i>	0.191	0.453	0.025

Ratios of nitrogen/ carbon (N/C), oxygen/carbon (O/C) and phosphorus/carbon (P/C) of cell walls

Microbial surface thermodynamics is a reflection of the physico-chemistry of bacterial surfaces, which is controlled by macromolecular components, e.g., lipo-polysaccharide, protein and exopolymers, varying in quantity with growth conditions and from strain to strain. The amount of the macromolecular components can be represented by a variety of different functional groups (Strevett and Chen, 2003; Vadillo-Rodríguez et al. 2004). In previous works, cell surface hydrophobicity, assessed by the water contact angle, was directly correlated with the concentration of nitrogen or carbon involved in hydrocarbon form and inversely correlated with the oxygen concentration (Rouxhet et al.; 1994, Van der Mei et al., 2000; Boonaert and Rouxhet, 2000). In this study, the higher hydrophilic character of *S. marcescens* is in agreement with its higher value of O/C, which can also suggest the presence

of capsular polysaccharide material (Van der Mei et al., 2000). The XPS results corroborated the similarity of the hydrophobicity values. The results obtained through XPS analysis indicate that *P. aeruginosa* shall be the most hydrophobic strain because it has the higher N/C ratio. Cerca et al., (2005) correlated the N/C ratio with cell surface hydrophobicity, with the less hydrophobic cells exhibiting the lower N/C ratio. The presence of proteinic appendages is often reflected in a high nitrogen concentration at the cell surface (Rouxhet et al., 1994).

The number of cells of *Salmonella* Enteritidis (EMB, MUSC, PC, AL), *P. aeruginosa* and *S. marcescens* adhered to stainless steel are presented in Figure 1 and Figure 2. The extent of adhesion of *P. aeruginosa* and *Salmonella* MUSC was statistically ($p < 0.05$) higher compared with the other cells.

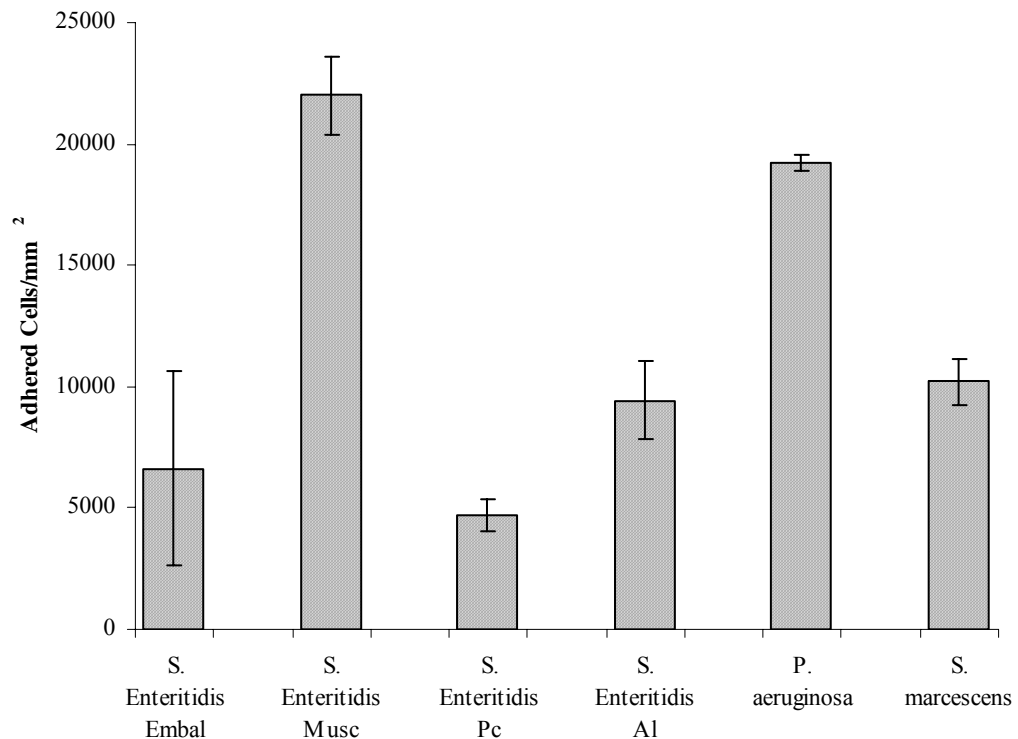


Figure 1. Adherence of the cells to stainless steel 304. The final concentrations of 10^8 for *Salmonellas* and *S. marcescens*, for *P. aeruginosa* the concentrations were dilute 10 fold for assays.

P. aeruginosa showed the higher degree of hydrophobicity and the higher number of cells adhering to stainless steel. Liu et al. (2004) predicted that when both bacterial and support surfaces are hydrophobic, microbial adhesion is highly facilitated, if both bacterial and support surfaces are hydrophilic, microbial adhesion would proceed with difficulty, and increased cell surface hydrophobicity would favor cell adhesion on both hydrophilic and hydrophobic support surface. Also, Assanta et al. (2002) suggested that *Arcobacter butzleri* could attach in higher numbers to surfaces with low surface free energy and *Aeromonas hydrophila* cells had a tendency to attach in high numbers to hydrophobic surfaces. A recent study by Henriques et al. (2004), reported the increase in the number of adhered yeast cells to acrylic by an increase in the interactions between the electron-donor groups of acrylic and the electron-acceptor groups of cells. In consonance, the greater extent of adhesion of *P. aeruginosa* and *S. Enteritidis* MUSC observed in the present study could also be attributable to the ease of interaction between the stainless steel electron-donor groups and the cells electron-acceptor groups.

As all *Salmonella* strains studied showed similar cell wall compositions, their cell surface physico-chemical properties and the physico-chemical interaction with the adhesion substratum were expected to be similar as well. Nevertheless, *Salmonella* Enteritidis MUSC showed a higher ability to adhere to SS304. The possible explanation can rely in its ability to establish preferential Lewis acid-base interactions with an electron donor substratum. Consequently, the concept of overall hydrophobicity (ΔG_{lwl}), i.e. considering its components, is very useful for understanding the role of hydrophobic/hydrophilic interaction between cells and support surfaces in the microbial adhesion process. A more thorough understanding of the interactions that occur between the bacterial cells and the substratum may lead to the development of methods to prevent bacterial adhesion, for instance by substratum surface modification.

Acknowledgements

Kelly Oliveira fully acknowledges CAPES/ Brazil for the grant BEX 0891/01-0.

References

- Assanta, M.A., Roy, D., Lemay, M.J. and Montpetit, D. (2002) Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. *J. Food Prot.* 65, 1240-1247.
- Barners, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R. and Chamberlain, A.H.L. (1999) Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4543-4548.
- Bonafonte, M.A., Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Montuega, L., Garcia.Ros, D. and Gamazo, C. (2000) The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol. Let.* 191, 31-36.
- Boonaert, C.J.P. and Rouxhet, P.G. (2000) Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2548-2554.
- Boulangue-Peterson, L. (1996) Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling* 10, 275-300.
- Bruinsma, G.M., van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (2001) Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*, 22, 3217-3224.
- Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W.J., de Jong, H.P. and Arends, J. (1984) Measurements of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 980-983.
- Cerca, N., Pier, G.B., Vilanova, M., Oliveira, R. and Azeredo, J. (2005) Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research Microbiol.* 156, 506-514.
- Cunliffe D., Smart C.A., Alexander C., Vulfson E.N. (1999) Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4995-5002.
- Dickson J.S. and Koohmaraie M. (1989) Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl. Env. Microbiol.*, 55, 832-836.

- Donlon, B. and Colleran, E. (1993) A comparison of different methods to determine the hydrophobicity of acetogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 17, 27-37
- Eneroth, A., Ahrne, S. and Molin, G. (2000) Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Int. Dairy J.* 10, 325-331.
- Flint, S.H., Brooks, J.D. and Bremer, P.J. (2000) Properties of stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J. Food Eng.* 43, 235-242.
- Gorman, R., Bloomfield, S. and Adley, C. C. (2002) A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 143-150.
- Gough, N.L. and Dodd, C.E.R. (1998) The survival and disinfection of *Salmonella typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control* 9, 363-368.
- Gran, H.M., Wetlesen, A., Mutukumira, A.N., Rukure, G. and Narvhus, J.A. (2003) Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small scale dairies in Zimbabwe. *Food Control* 14, 539-544.
- Henriques, M., Azeredo, J. and Oliveira, R. (2004) Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 33, 235-241.
- Hilton, A.C. and Austin, E. (2000) The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting. *Int. J. Environ. Res.* 10, 257-261.
- Holah, J.T., and Thorpe, R.H. (1990) Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *J. App. Microbiol.* 69, 599-608.
- Hood, S.K. and Zottola, E.A. (1997) Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. Food Microbiol.*, 37, 145 – 153.
- Joseph, B., Otta, S.K. and Karunasagar, I. (2001) Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 367-372.
- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. and Beumer, R.R. (2003) Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 227-236.
- Kusumaningrum, H.D., van Putten, M.M., Rombouts, F.M. and Beumer, R.R. (2002) Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. *J. Food Prot.* 65, 61-65.

- Liu, Y., Yang S.F. Li Y., Xu H., Qin L., Tay J.H.. (2004) The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J. Biotech.* 110, 251-256.
- Millsap, K.W., Reid, G., van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (1996) Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. *Biomaterials* 18, 87-91.
- Parker, S.G., Flint, S.H., Palmer, J.S. and Brooks, J.D. (2001) Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J.App. Microbiol.* 90, 901-908.
- Pereira, M.A., Alves, M.M, Azeredo, J., Mota, M. and Oliveira, R. (2000) Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. *J. Ind.Microbiol.Biotechnol.* 24, 181-186.
- Rossoni, E.M.M. and Gaylarde, C.C. (2000) Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int. J. Food Microbiol.*, 61, 81-85.
- Rouxhet, P.G., Mozes, N., Dengis, P.B., Dufrière, Y.F., Gerin, P.A. and Genet, M.J. (1994) Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2, 347-369.
- Sinde, E. and Carballo, J. (2000) Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17, 439 - 447.
- Singh, B.R., Singh, Y. and Tiwari, A.K. (1997) Characterization of virulence factors of *Serratia* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 34, 259-266.
- Strevett, K.A. and Chen, G. (2003) Microbial surface thermodynamics and applications. *Res. Microbiol.*, 154, 329-335.
- Teixeira, P. and Oliveira, R. (1999) Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. *J. Adhesion Sci. Technol.* 13, 1287-1294.
- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. and Vieira, M.J. (2005) Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiol.* 22, 247-251.
- Vadillo-Rodríguez, V. And Busscher, H.J., Norde, W., de Vries, J. and van der Mei, H. (2004) Atomic force microscopic corroboration of bond aging for adhesion of *Streptococcus thermophilus* to solid substrata. *J.Colloid Interface Sci.*, 278, 251-254.
- Van der Mei, C., De Vries, J. and Busscher, H.J. (2000) X-ray photoelectron spectroscopy for the study of microbial cell surfaces. *Surface Science Rep.* 39, 1-24.

- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A.J.B. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *App. Environ. Microbiol.* 53, 1893-1897.
- van Oss, C.J, Chaudhury, M.K and Good, R.J. (1987) Monopolar surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 28, 35-64.
- van Oss, C.J., Good, R.J. and Chaudhury, M.K (1988) Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir* 4, 884-891.
- van Oss, C.J., Ju, L., Chaudhury, M.K. and Good, R.J. (1989) Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *J. Colloid Interface Sci.* 128, 313-319.
- Vogler, E.A. (1998) Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 74, 69-117.

Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to materials used in kitchen surfaces

KELLY OLIVEIRA³, TEREZA OLIVEIRA¹, PILAR TEIXEIRA², JOANA

AZEREDO² AND ROSÁRIO OLIVEIRA^{2*}

1Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, C.P. 6001, CEP:87051-970, Londrina, PR, Brasil.

2Centro de Engenharia Biológica - CEB, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

3Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR, Brasil

* Author for correspondence:

e-mail: roliveira@deb.uminho.pt

tel: 351 253604409

fax: 351 253678986

ABSTRACT

Contamination of kitchen surfaces due to bacteria present in foodstuff is one of the main causes of foodborne outbreaks. Pathogenic bacteria as *Salmonella* species can be transferred from contaminated food to kitchen surfaces and from there to non contaminated food. This phenomenon is commonly assigned as cross contamination. Salmonella infections are an important cause of foodborne disease and *Salmonella* Enteritidis is the most commonly isolate in the last years.

This study attempted to investigate the factors that are involved in the adhesion of four *Salmonella* Enteritidis isolates to different materials (polyethylene, polypropylene and granite) used as cover surfaces or as other utensils in kitchens. Surface hydrophobicity and roughness were determined in order to assess the differences in the extent of adhesion. The main conclusion to be drawn is that *Salmonella* sp. adhesion is strongly strain dependent, despite the similar degree of hydrophobicity displayed by all the strains assayed.

Key words: Adhesion; *Salmonella* Enteritidis; kitchen surfaces; cross contamination

INTRODUCTION

Considerable research interest has been focused on the ability of bacteria to adhere to solid surfaces, with subsequent formation of stable biofilms, and its relevance to environmental, medical, dental and industrial applications has been increasingly studied (7). The attachment of microorganisms and subsequent development of biofilms could be a continuous source of contamination to foods coming in contact with them when formed on contact surfaces. During preparation of naturally contaminated food, potential pathogens are frequently spread to hands and food processing surfaces. Those cells adhered to surfaces of domestic kitchen are not usually removed by the normal cleaning procedure and therefore could be a source of contamination of other foods coming in contact with such surfaces and objects. *Salmonella* sp. are important pathogenic bacteria which are of considerable significance to the food processing industry (3,17,12,18). *Salmonella* infections are an important cause of food borne bacterial disease (19). In many countries *Salmonella* Enteritidis has been the most commonly isolate in food borne diseases in the last years (1, 20, 9).

Several studies have shown that many sites in the kitchen become contaminated when food harboring bacteria is prepared and this may be an important source of *Salmonella* infections in the home (31, 5, 13). The occurrence of *Salmonella* sp. in chicken carcasses can change between 0.024 to 85.0%, which demonstrates that chicken carcasses are a strong potential source of bacterial contamination of utensils and kitchen surfaces.

Materials that retain fewer microorganisms after cleaning would be the hygienic choice and present the minor risk of cross contamination. The wear of surfaces will affect their finish and potentially their hygienic status (27). Ceramics are commonly used as hygienic and impervious floor coverings. Chopping boards are more prone to cross-contamination, particularly from juices of raw meat and poultry remaining on the surface resulting in transfer of microorganisms to other foods subsequently prepared on the same surface (10). In recent

years there has been a steady rise in the use of plastic materials in food industry (15) and many studies have been conducted to evaluate biofilm formation by *Salmonella* spp. on plastic surfaces (6, 17, 12, 19).

Biofilms have the potential to act as a chronic source of microbial contamination, which may compromise food quality and represent a significant health hazard. To control these problems, it has been recognized that a greater understanding of the interaction between microorganisms and food-processing surfaces is required (2). The factors involved in bacterial colonization of inert support materials in kitchen remain poorly understood. Knowledge of the mechanisms governing adhesion and formation of the first layer on such supports is, however, of particular relevance to the prevention of food borne disease. Under these considerations, the aim of this work was to study the factors that are involved in the adhesion of *Salmonella* Enteritidis to different materials (polyethylene, polypropylene and granite) used as cover surfaces or as other utensils in kitchens.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth

Four strains of *Salmonella* Enteritidis were selected for this study: two *Salmonella* Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis EMB and *Salmonella* Enteritidis MUSC), were previously isolated from poultry, *Salmonella* EMB were isolated from water of packaged chicken and *Salmonella* Enteritidis MUSC from chicken breast. The other two *Salmonella* (*Salmonella* Enteritidis PC and *Salmonella* Enteritidis AL) were isolated from patients with food borne disease outbreaks.

All bacterial isolates were maintained in trypticase soy agar (TSA). Every strain was subcultured twice in trypticase soy broth (TSB) at 37°C in an orbital shaker (130 rpm), overnight. The cells were then harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min and washed

three times with phosphate buffer saline (PBS 0,1M pH 7). The pellets were resuspended in PBS to an inoculum level of 10^8 CFU/ml, determined by optical density.

Materials

The test surfaces were: polyethylene utilized in cutting boards, polypropylene from a basin and granite (Pedras Salgadas, Portugal) commonly utilized as bench cover in domestic kitchens. For the adhesion experiments, the materials were cut in coupons of 0.8 cm x 0.8 cm in the case of polypropylene and 1.8 cm x 1.8 cm for polyethylene and granite. For contact angle measurements, materials were cut in slides of 7.0 cm x 2.5 cm, washed in a solution of a commercial detergent (Sonasol Pril, Henkel Ibérica S.A., Portugal) in ultrapure water for 30 min and then thoroughly rinsed in ultrapure water (to remove any remaining detergent), followed by immersion in ethanol 90 % over 30 min to completely degrease the surface.

Hydrophobicity and free energy of adhesion

Hydrophobicity was evaluated through contact angle measurements and using the approach of van Oss and co-workers (22,26,25). In this approach, the degree of hydrophobicity of a given material (1) is expressed as the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water (w) - ΔG_{1w1} . If the interaction between the two entities is stronger than the interaction of each entity with water the material is considered hydrophobic ($\Delta G_{1w1} < 0$), conversely, for a hydrophilic material $\Delta G_{1w1} > 0$. ΔG_{1w1} can be calculated through the surface tension components of the interacting entities. The surface tension is considered to have two components, one apolar due to Lifshitz-van der Waals interactions (γ^{LW}) and one polar due to Lewis acid-base interactions (γ^{AB}). The latter comprises two parameters: γ^+ and γ^- the electron acceptor and electron donor, respectively. The surface tension components of a solid material are obtained by measuring the contact angles of three pure liquids (one apolar and two polar), with well known surface tension components (24).

Contact angle measurement

Contact angle measurements (at least 25 determinations for each liquid and for each material and microorganism) were performed automatically with the aid of an image analysis system (G2/G40) installed in a standard contact angle apparatus (Kruss-GmbH). The images were transmitted by a video camera to a 486 DX4 100 MHz personal computer for evaluation. All the measurements were performed at room temperature. In the case of bacterial cells the measurements were performed on a cell lawn using the sessile drop method described by Busscher et al. (4). Briefly, bacteria were deposited on a cellulose acetate membrane filter (pore diameter of 0.45 μm) by filtration of the suspension using negative pressure. To standardize the moisture content, the filters were then transferred onto agar in Petri dishes containing 1% (w/v) agar with 10% (v/v) glycerol. Measurements of water contact angles were carried out at 25°C and three liquids with different polarities were used, water (W), formamide (F) and α -bromonaphthalene (α -B)

Contact angle measurements on the materials was determined by the same technique, with direct measurements of contact angles on polyethylene, polypropylene and granite surfaces, after degreasing and cleaning.

Adhesion assays

The coupons of the materials were immersed in 2 ml of each bacterial suspension containing 10^8 CFU/ml. After 1 h at 37°C with constant shaking at 100 rpm, the coupons were rinsed twice with PBS to remove poorly adhered bacteria. An aliquot of 20 μl /ml of a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution was added to each well containing the plates and incubated for 30 min in the dark. After this time, the wells were rinsed with sterile distilled water and the adherent microorganisms were quantified by automatic enumeration using epifluorescence microscopy. Thirty fields per coupon were scanned and the fluorescent cells were enumerated. Computerized image analysis software (Image-Pro Plus, Media Cybernetics) was used for the quantitative estimation of the adherent cells. All experiments were done in triplicate.

Roughness

The surface roughness of the materials studied was evaluated by a non-contact laser stylus tracing (Perthometer S4P – Perthen GmbH, Gottingen, Germany), to determine the R_a and R_z values. The R_a value provides the arithmetical average value of all departures from the mean line throughout the sampling length, the R_z value is the sum of the height of the highest peak plus the lowest valley depth within a sampling length. The default evaluation length consists of five sample lengths.

Statistical analysis

The resulting data were analyzed using SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences). One-way ANOVA with Bonferroni test was used to compare the number of adhered cells. All tests were performed with a confidence level of 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 presents the number of cells of *Salmonella* Enteritidis (EMB, MUSC, PC, AL) adhered to the materials tested. Statically, the extent of adhesion of the different strains to the materials assayed was different ($p < 0.05$). *Salmonella* EMB adhered in greater extent to granite while *Salmonella* MUSC adhered in greater extent to polypropylene and in a less extent to granite. The extent of adhesion of *Salmonella* AL was almost the same to all the materials tested and *Salmonella* PC adhered in a greater extent to granite, followed by polypropylene and, at last, by polyethylene. The source of *Salmonella* spp. isolates does not seem to affect the ability of adhesion. Stepanovic et al. (18) also refer that the source of *Salmonella* spp. isolates (from humans, animals or foods) did not affect biofilm formation.

Several studies report different extents of adhesion of *Salmonella* spp. and, generally, it was found that *Salmonella* species adhere in greater extent to the more hydrophobic materials

(17, 8). Joseph and co-authors (12) studied the ability of biofilm formation of two poultry *Salmonella* isolates to plastic, cement and stainless steel and observed that biofilm formation of both isolates were very similar with the highest density being on plastic followed by cement and stainless steel. The ongoing epidemic of Enteritidis may be related, in part, to the success of the bacterium in passing down the food chain with adherence to inanimate surfaces contributing to persistence as well as communicability (30). Enteritidis strains may adhere to surfaces such as eggs, food-processing equipment, animal carcasses and farm-yard implements over a wider range of environmental conditions (30). Of the many serotypes of *S. enterica*, Enteritidis is unique in possessing the ability to elaborate SEF14 and SEF17 fimbriae, both of which contribute to adherence although under different environmental conditions. Stepanovic et al (18) demonstrated that both *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogens* have higher ability for biofilm formation on plastic surfaces and, generally, *Salmonella* spp. produces more biofilm in nutrient-poor medium. This fact aggravates the phenomenon of cross contamination in food manipulation.

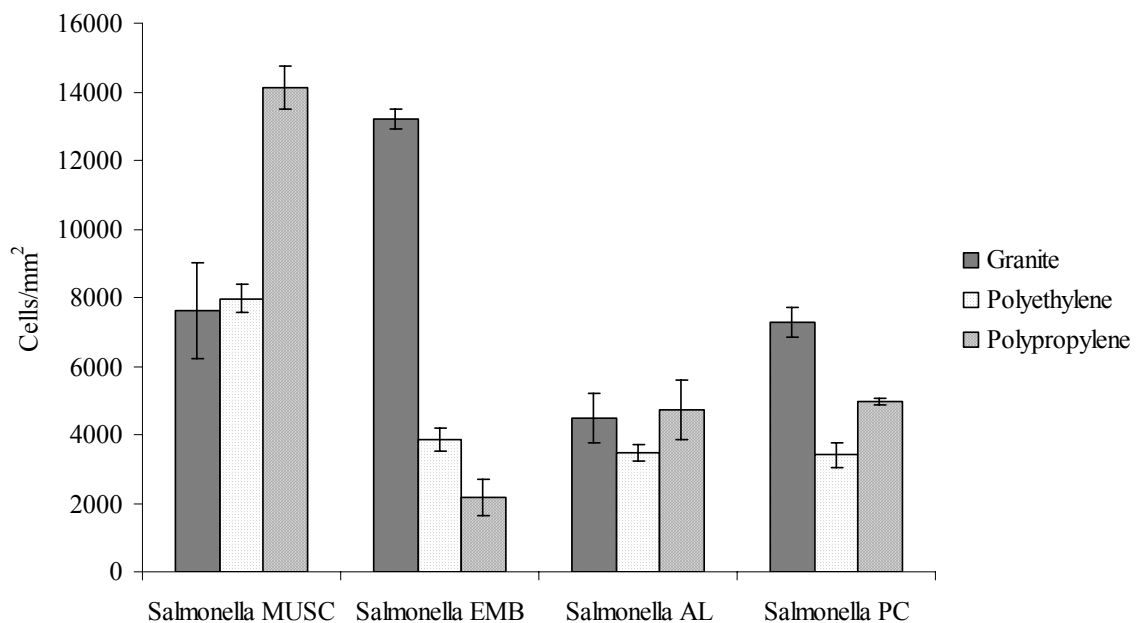


Figure 1 – Number of adhered cells/mm² of *Salmonella* Enteritidis strains to the different materials studied.

It is well known that bacterial surface hydrophobicity, surface charge, cell density and the presence of exopolysaccharides are determinant factors in the adhesion process. For example, Sinde and Carballo (17) referred that differences found in the degree of attachment of *Salmonella* and *L. monocytogenes* indicate that there must be other factors on the surface of the bacteria, rather than hydrophobicity, contributing to bacteria attachment to food contact surfaces. In the other hand, Walker et al. (29) studied the effect of pH, temperature and contact surface on the elaboration of fimbriae (SEF 21, SEF 14 e SEF 17) and flagella and found differences among the four strains assayed. Hood and Zottola (11) observed that both growth media and surface conditioning were significant factors affecting the level of adherence. Surface hydrophobicity and roughness were determined in order to explain the differences in the extent of adhesion.

The water contact angles on bacterial lawns as well as surface tension components and hydrophobicity of the strains studied are presented in Table 1. The water contact angle value gives preliminary information about the degree of surface hydrophobicity. The sample is considered hydrophobic or hydrophilic if the angle is higher or lower than 65°, respectively (28). According to this criterion, all *Salmonella* strains assayed are hydrophilic, with values of water contact angles ranging from 9.7° to 14.0° and being somewhat lower than those reported by Sinde and Carballo (17) (25.4 – 35.0) for other *Salmonella* strains. The different serovars studied can explain this fact (17). Teixeira et al. (21) also observed a great variation of hydrophobicity among strains of the same bacterial species. The changeable complexity of the cellular surface results in hydrophobic or hydrophilic appendices and other macromolecular components that can confer different behaviours according to the method of evaluation. In practice, the non-uniformity of bacterial surface can result in an apparently hydrophilic bacterium in an assay and hydrophobic in another one (7). Affinity techniques, like microbial adhesion to hydrocarbons - MATH (16) - are more prone to variability and by such techniques

hydrophobicity is only assessed qualitatively (14). Using the approach of van Oss (23), it is possible to determine the absolute degree of hydrophobicity of any substance (1) vis-à-vis water (w), which can be precisely expressed in applicable S.I. units. Accordingly, all *Salmonella* strains studied were similarly hydrophilic (Table 1), which is in consonance with the classification obtained through the water contact angles.

Table 1 - Values of water contact angles (in degrees), values of the components of surface tension (γ^{LW} , γ^+ , γ^- , γ^{AB}) and degree of hydrophobicity (ΔG_{1w1}) of bacterial cells (in mJ/m^2).

Strain	Water contact angle (\pm SD)	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ^{AB}	ΔG_{1w1}
<i>Salmonella</i> MUSC	13.5 (1.6)	26.00	4,60	51.30	30.99	31.70
<i>Salmonella</i> <u>EMB</u>	10.9 (2.23)	39.89	0.97	55.99	1.94	34.12
<i>Salmonella</i> <u>AL</u>	9.7 (1.95)	39.50	1.05	55.84	15.32	33.79
<i>Salmonella</i> <u>PC</u>	14.0 (4.42)	38.06	1.22	54.48	16.31	32.28

The values of the contact angles (in degrees) as well as the values of the surface tension components and the degree of hydrophobicity (ΔG_{1w1}) of the materials assayed are presented in Table 2. Water contact angles of the materials were statistically different ($P < 0.05$) among them. According to the results, all the materials are hydrophobic ($\Delta G_{sws} < 0$). The polymers present values of the free energy of self-interaction in water very similar ($-52.12 \text{ mJ}/\text{m}^2$ and $-49.96 \text{ mJ}/\text{m}^2$, respectively), while granite presents a lower value ($-4.7 \text{ mJ}/\text{m}^2$), displaying a less hydrophobic character. Considering the surface tension parameters, granite is a surface

predominantly electron donor (higher values of γ^-), with a low electron acceptor parameter (γ^+). Its γ^- is much higher than the γ^- of the other surfaces in study. Probably this fact is due to the polar groups formed by O and N, which are electron donors, while polymer surfaces are formed only by carbon and hydrogen atoms without polar groups as can be observed by the γ^{AB} parameter that corresponds to the polar component. However, in the present situation it is not possible to hypothesize about a specific role of Lewis acid-base interactions in the adhesion process. At least it is not possible to establish any correlation between the electron donor and electron acceptor capabilities of the interacting surfaces.

Table 2 - Water contact angle (in degrees), values of the surface tension components (γ^{LW} , γ^+ , γ^- , γ^{AB}) and degree of hydrophobicity (ΔG_{1wl}) of the materials assayed (in mJ/m^2).

Surface	Water contact angle (\pm SD)	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ^{AB}	ΔG_{1wl}
Granite	53.4 (\pm 3.6)	41.12	0.28	26.26	5.4	-4.72
<i>Polyethylene</i>	74.3 (\pm 8.3)	39.89	0.50	5.56	3.35	-49.96
<i>Polypropylene</i>	87.8 (\pm 3.4)	41.93	0.06	7.76	1.42	-52.12

The values of surface roughness (Ra and Rz) are shown in Table 3. Polyethylene was the roughest material (with a higher value of Ra - longitudinal $36.02 \mu\text{m}$ and transversal $30.91 \mu\text{m}$ - and of Rz -longitudinal $195.96 \mu\text{m}$ and transversal $145.3 \mu\text{m}$), but it was the material displaying less extent of bacterial colonization. Flint et al. (8) referred that the adhesion of thermo-resistant Streptococci to stainless steel with surface roughness (Ra) values ranging between 0.5 and $3.3 \mu\text{m}$ was largely independent of the substrate topography although

bacterial entrapment may occur at Ra values of 0.9 μm . Barnes et al. (2) compared the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polished stainless steel and to rougher stainless steel and they observed a greater number of *S. aureus* adhered to the rougher surface. According to the same authors, scanning electron microscopy micrographs showed that organisms did not orient themselves exclusively along polishing lines. As a matter of fact, it has been widely suggested that surface roughness may play an important role in the adhesion of microorganisms by protecting them from shear forces and increasing the available surface area. However, for a microbial cell to be entrapped due to surface roughness it is necessary to have enough space available between two consecutive peaks of surface topography for the cell to sit there. It has to be noticed that the same value of Ra can correspond to different surface topographies. Actually, Ra measures the average height and depth of peaks and valleys but not the distance between them. As adhesion is dependent on the number of contact points between the interacting surfaces, it might be the distance between peaks that also determines the “peak density” (i.e. low vvvvvv or high vvvvvvvv), which is responsible for the extent of contact between the microbial cell and the surface. This means that a higher number of peaks close together will promote more contact points between the surface and the cell sitting on it. Under this reasoning, the most common parameter used to express surface roughness is not the most appropriate to assess the effect of roughness on microbial adhesion.

Table 3 - Roughness of the surfaces studied (μm).

Surface	Ra		Rz	
	Longitudinal	Transversal	Longitudinal	Transversal
Granite	32.38	24.88	155.16	114.36
<i>Polyethylene</i>	36.02	30.91	195.96	145.3
<i>Polypropylene</i>	6.16	0.19	39.6	4.84

As the adhesion process is “multi-factorial” involving several physico-chemical and microbiological factors, for a better understanding, it would be necessary to investigate the role of cell wall proteins as well as fimbriae and flagella. Furthermore, other structures such as pili, polysaccharides, capsules or “*slime layers*” have also been related to the adhesion process.

Considering all the tentative explanations based on physico-chemical properties of bacterial cells and surfaces, it is not possible to establish any direct correlation to elicit the hypothesis of a reasonable model of adhesion. The main conclusion to be drawn is that *Salmonella spp.* adhesion is strongly strain dependent, despite the similar degree of hydrophobicity displayed by all the strains assayed.

ACKNOWLEDGEMENTS

Kelly Oliveira fully acknowledges CAPES/ Brazil for the grant BEX 0891/01-0.

REFERENCES

1. Austin J.W., G.Sanders, W.W. Kay, W. John, and S. K. Collinson. 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 295-301.
2. Barners, L.M., M.F. Lo, M.R. Adams, and A.H.L. Chamberlain. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4543-4548.
3. Bonafonte, M.A., C. Solano, B. Sesma, M. Alvarez, L. Montuega, D. García-Ros, and C. Gamazo. 2000. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 31-36.
4. Busscher, H.J., A.H. Weerkamp, H.C. van der Mei, A.W.J. van Pelt, H.P. de Jong, and J. Arends. 1984. Measurements of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 980-983.
5. Chen, Y.H., K.M. Jackson, F.P. Chea, and D.W. Schaffner. 2001. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *J Food Prot.* 64: 72-80.
6. Cunliffe, D., C.A. Smart, C. Alexander, and E.N. Vulfson. 1999. Bacterial adhesion at synthetic surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4995-5002.
7. Donlon, B., and E. Colleran. 1993. A comparison of different methods to determine the hydrophobicity of acetogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 17: 27-37.
8. Flint, S.H., J.D. Brooks, and P.J. Bremer. 2000. Properties of stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J. Food Eng.* 43: 235-242.
9. Gawande, P.V., and A.A. Bhagwat. 2002. Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. during acid challenge: a model study using polyethersulfone membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:86-91.
10. Gough, N.L. and C.E.R. Dodd. 1998. The survival and disinfection of *Salmonella typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control* 9: 363-368.
11. Hood, S. K. and E. A. Zottola. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. Food Microbiol.* 37: 145-153.
12. Joseph, B., S.K. Otta, and I. Karunasagar. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol* 64: 367-372.

13. Kusumaningrum, H.D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger, and R.R. Beumer. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 227-236.
14. Oliveira, R., J. Azeredo, P. Teixeira, and A.P. Fonseca. 2001. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion, p. 11-22. In P. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Verran and J. Walker (eds), *Biofilm Community Interactions: Chance or Necessity?*, Bioline.
15. Pompermayer D.M.C., and C.C. Gaylarde. 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol.* 17: 361-365.
16. Rosenberg, M. 1984. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 22: 289-295.
17. Sinde, E. and J. Carballo. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17: 439 - 447.
18. Stepanovic S., I. Cirkovic, and L. Ranin, and M. Svabic-Vlahovic. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. App. Microbiol.* 38: 428-432.
19. Stepanovic, S., I. Cirkovic, V. Mijac, and. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp.. *Food Microbiol.* 20: 339-343.
20. Stock, K. and A. Stolle. 2001. Incidence of *Salmonella* in minced meat produced in a European Union-Approved cutting plant. *J Food Prot.* 64:1435-1438.
21. Teixeira P., Z. Lopes, J. Azeredo, R. Oliveira and M. J. Vieira. 2004. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiol.* 22: 247-251.
22. van Oss, C.J, M.K. Chaudhury, and R.J. Good. 1987. Monopolar surfaces. *Adv. in Colloid Interface Science* 28: 35-64.
23. van Oss, C.J. 1997. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 2:03-512.
24. Van Oss, C.J. and R.J. Good. 1989. Surface tension parameters and the solubility of polymers and biopolymers: the role of polar and apolar interfacial free energies. *J. Macromol. Sci. – Chem.* A26: 1183-1203.
25. van Oss, C.J., L.Ju, M.K. Chaudhury, and R.J. Good. 1989. Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *J. Colloid Interface Science* 128: 313-319.

26. van Oss, C.J., R.J. Good, and M.K Chaudhury. 1988. Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir* 4: 884-891.
27. Verran, J., R.D. Boyd, K. Hall, and R.H. West. 2001. Microbiological and chemical analyses of stainless steel and ceramics subjected to repeated soiling and cleaning treatments. *J Food Prot.* 64: 1377-1387.
28. Vogler, E.A. 1998. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid. Interfac. Sci.* 74: 69-117.
29. Walker S. L., M. Sojka, M. Dibb-Fuller and M. J. Woodward. 1999. Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteritidis. *J. Med. Microbiol.* 48: 253 - 261.
30. Woodward, M.J., M. Sojka, K.A. Sprigings, and T.J. Humphrey. 2000. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J. Med. Microbiol.* 49: 481-487.
31. Zhao P., T. Zhao, M.P. Doyle, J.R. Rubino, and J. Meng. 1998. Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *J Food Prot.* 61:960-963.