

**DARA ELIZABETH BARBOSA RODRIGUES**

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES FORMADOS POR  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE LEITE**

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

Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti

Coorientadores: Evandro Martins  
Reinaldo Francisco Teófilo  
Solimar G. Machado

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa - Campus Viçosa

T

R696c  
2021 Rodrigues, Dara Elizabeth Barbosa, 1996-  
Caracterização de biofilmes multiespécies formados por bactérias  
isoladas de leite / Dara Elizabeth Barbosa Rodrigues. - Viçosa, MG,  
2021.

48 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-47.

1. Biofilmes. 2. Bactérias do ácido lácteo. 3. Indústria de laticínios  
- Eliminação de resíduos - Análise. 4. Análise espectral Raman.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia.  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.35

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523

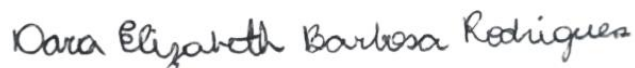
**DARA ELIZABETH BARBOSA RODRIGUES**

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES FORMADOS POR  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE LEITE**

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

APROVADA: 30 de março de 2021.

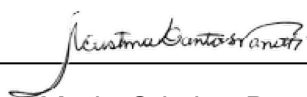
Assentimento:



---

Dara Elizabeth Barbosa Rodrigues

Autora



---

Maria Cristina Dantas Vanetti  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as bênçãos por mim recebidas e por sempre está presente em minha vida.

Aos meus pais Dete e Nivaldo, por todo amor e carinho, pela confiança e por nunca medir esforços para ajudar em minha formação.

Aos meus irmãos, por todo carinho e incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo ensino de excelência. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, paciência, compreensão, todo o conhecimento repassado, pelo exemplo de profissionalismo e empatia.

Ao Professor Evandro, pela disponibilidade e sugestões.

A Sol, por toda confiança e disponibilidade desde o início da minha vida acadêmica.

Ao Professor Luciano do Departamento de Física pela disponibilidade, sugestões e por toda a paciência em ensinar.

À banca examinadora, Prof. Evandro, Prof. Luciano, Prof. José Guilherme e Prof<sup>a</sup> Solimar, pela disponibilidade e sugestões.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia que colaboraram para o meu aprendizado e formação.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Cleo, Deisy, Gabriel, Léo, Leandro, por todas as dicas dadas e pela companhia. Ao pessoal do laboratório LAMAP e ao doutorando em Física, Paulo Victor, pela ajuda nas análises.

Meu muito obrigado a todos que de alguma forma contribuíram e torceram para a conclusão de mais essa etapa.

## RESUMO

RODRIGUES, Dara Elizabeth Barbosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Caracterização de biofilmes multiespécies formados por bactérias isoladas de leite.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Evandro Martins, Reinaldo Francisco Teófilo e Solimar Gonçalves Machado.

Biofilmes multiespécies formados em equipamentos na indústria do leite resultam em diversos problemas na qualidade dos produtos, para a saúde dos consumidores, além de prejuízos financeiros. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência dos fatores como temperatura e nutrientes na estrutura e composição química do biofilme multiespécies bacteriano utilizando técnicas microscópicas e espectroscopia vibracional. *Buttiauxella agrestis*, *Rahnella inusitata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus laudensis* e *Lactococcus garviae*, isolados de biofilmes formados na presença de leite cru a 7 °C, foram avaliados quanto a capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno contendo leite em pó reconstituído (LDR) a 1% e 10% como meio de cultivo, às temperaturas de 7 °C e 25 °C. Os melhores formadores de biofilmes individuais e multiespécies nas condições avaliadas foram *P. fluorescens* e *S. aureus* e estas espécies foram selecionadas para a continuidade dos estudos. Biofilmes em cultura pura ou em co-cultivo de *P. fluorescens* e *S. aureus* foram formados a 7 °C em superfície de aço inoxidável por 10 dias. O meio de cultivo e inóculo foram trocados a cada dois dias e foram feitas análises de quantificação de células aderidas, observação em microscópio de epifluorescência e de varredura e, a composição do biofilme foi avaliada pela técnica de espectroscopia Raman. O crescimento das bactérias em co-cultivo não afetou o número de células no biofilme formado em aço inoxidável quando comparado com o biofilme individual. Nos biofilmes formados por *P. fluorescens* na presença de LDR 1% foi constatado maior número de células sésseis ( $P > 0,05$ ) quando comparado ao LDR 10% no 6º dia de incubação. As imagens obtidas na microscopia de epifluorescência e de varredura corroboram os resultados da quantificação do número de células, com a população de *P. fluorescens* superior à de *S. aureus* em biofilmes simples e em co-cultivo. A partir da espectroscopia Raman foi possível observar a homogeneidade dos biofilmes e que todos os biofilmes formados eram compostos por carboidratos, proteínas, lipídeos e

DNA. No entanto, as intensidades dos picos Raman de cada componente variaram de acordo com a espécie e a concentração de LDR utilizada. Pode-se concluir que na temperatura de 7 °C *P. fluorescens* formam biofilme individualmente ou multiespécie na superfície de aço inoxidável na presença de resíduos de leite, o que constitui um problema para a indústria laticinista. O conhecimento obtido sobre a composição do biofilme desses microrganismos contribuirá para a busca de métodos para evitar a formação dos biofilmes bem como para a sua remoção.

Palavras-chave: Multiespécies. Resíduos de leite. Raman.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Dara Elizabeth Barbosa, M.Sc., Universidade Federal Viçosa, March 2021. **Characterization of multi-species biofilms formed by milk isolated bacteria.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Evandro Martins, Reinaldo Francisco Teófilo and Solimar Gonçalves Machado.

Multispecies biofilm formed in the dairy industry's equipment result in several problems in the quality of products, financial losses, and health risks. The present work's objective was to evaluate the influence of factors such as temperature and nutrients on the structure and chemical composition of the bacterial multispecies biofilm using microscopic techniques and vibrational spectroscopy. *Buttiauxella agrestis*, *Rahnella inusitata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus laudensis*, and *Lactococcus garviae* isolated from biofilm formed in the presence of raw milk at 7 °C were evaluated for biofilm formation capacity in polystyrene microplates containing 1% and 10% reconstituted whole milk (RWM) at 7 °C and 25 °C. The best individual and multispecies biofilm makers in the evaluated conditions were *P. fluorescens* and *S. aureus*, and these species were selected for further studies. Biofilms in pure culture or co-culture were formed at 7 °C on a stainless steel surface for 10 days. The culture medium and inoculum were changed every two days, and analyzes were performed to quantify adhered cells. Observation of under an epifluorescence and scanning microscope was done to evaluate biofilm formation and structure, and Raman's spectroscopy technique evaluated the biofilm composition. The growth of bacteria in co-cultivation did not affect the number of cells of both species in the biofilm formed in stainless steel. In biofilms formed in the presence of 1% RWM, a greater number of sessile cells was found ( $P > 0.05$ ) when compared to the 10% RWM on the 6th day of incubation. The images obtained in the epifluorescence and scanning microscopy corroborate the quantification results of the number of cells. The population of *P. fluorescens* was greater than that of *S. aureus* in single and multispecies biofilms. Raman spectroscopy allowed observing the homogeneity of biofilms and that all biofilms formed were composed of carbohydrates, proteins, lipids, and DNA. However, the Raman peaks' intensities varied according to the species and substrate. It can be concluded that at a temperature of 7 °C, *P. fluorescens* form biofilms individually or multispecies on the stainless steel surface in milk residues, which shows a problem for the dairy industry.

With the knowledge obtained about the biofilm composition of these microorganisms, it is essential to seek methods to prevent the formation of biofilms and their removal.

Keywords: Multiespécies. Waste of milk. Raman.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Adesão dos biofilmes individuais e multiespécie formados em microplacas de poliestireno a 7 °C por 10 dias e 25 °C por 48 h em LDR 1% e LDR 10% ..... 26
- Figura 2 – Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/cm<sup>2</sup>) de *S. aureus*; *P. fluorescens* em biofilmes de espécie única e de *S. aureus*; *P. fluorescens* em biofilmes multiespécies .....30
- Figura 3 – Imagens de microscopia de epifluorescência dos biofilmes no 5<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia de incubação a 7 °C .....34
- Figura 4 – Fotomicrografia de imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura dos biofilmes no 10<sup>o</sup> dia de incubação a 7 °C .....36
- Figura 5 – Espectros Raman de biofilme individual e multiespécies .....38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Adesão dos biofilmes individuais e multiespécie formados em microplacas de poliestireno a 7 °C por 10 dias e 25 °C por 48 h em LDR 1% e LDR 10%.....	28
---	----

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2.0 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	12
2.1 Biofilme	12
2.2 Composição de biofilmes bacterianos	15
2.3 Métodos para identificação da estrutura e composição do biofilme	16
2.4 Espectroscopia Raman	19
<b>3.0 MATERIAL E MÉTODOS</b>	21
3.1 Microrganismos utilizados	21
3.2 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno	21
3.3 Formação de biofilmes em aço inoxidável	22
3.5 Observação do biofilme por microscopia de epifluorescência	24
3.6 Observação do biofilme por microscopia eletrônica de varredura	24
3.7 Espectroscopia Raman	24
3.8 Análise dos espectros	25
3.9 Análises estatísticas	25
<b>4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	26
4.1 Biofilmes formados em microplacas de poliestireno	26
4.2 Biofilmes formados em cupons de aço inoxidável	29
4.2.1 Quantificação de células aderidas ao cupom de aço inoxidável	29
4.2.2 Estrutura dos biofilmes avaliados por microscopia de epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura	33
4.3 Composição química do biofilme obtida pela espectroscopia Raman	37
<b>5.0 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA</b>	40
<b>6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41
<b>7.0 APÊNDICE</b>	48

## 1.0 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades microbianas incorporadas em uma matriz viscosa produzida por células aderidas, denominada substância polimérica extracelular (EPS) e podem ser formados em diversos ambientes bióticos e abióticos. O desenvolvimento de biofilmes em equipamentos usados no transporte, armazenamento e processamento do leite é um grande problema para a indústria de lácteos, pois microrganismos deterioradores e patogênicos podem desprender do biofilme e contaminar o leite. A dificuldade em inativar células dos biofilmes formados em equipamentos é maior do que a dificuldade de inativação das células planctônicas, mesmo com o uso de sanitizantes e/ou altas temperaturas. Isso se deve à presença da EPS no biofilme que proporciona proteção e maior resistência a agentes físicos e químicos, evitando que estes alcancem as células aderidas mais fortemente à superfície.

A maior resistência das células microbianas quando em biofilme pode ser influenciada por fatores químicos e ambientais que determinam a composição da EPS, como exemplo, pH, disponibilidade de nutrientes e temperatura. Além disso, a composição da EPS também varia de acordo com as espécies de microrganismos envolvidos. Os biofilmes encontrados na indústria laticinista são, em sua maioria, multiespécies, isto é, aglomerados formados por um consórcio de espécies microbianas. O conhecimento da microbiota predominante e da composição da EPS de biofilmes formados em equipamentos na indústria de leite é de interesse para avaliar estratégias que visem minimizar sua formação ou remoção. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos fatores como temperatura e nutrientes na estrutura e composição química do biofilme multiespécies de *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*, utilizando técnicas microscópicas e espectroscopia vibracional.

## 2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Biofilme

Na natureza, os microrganismos não vivem como culturas puras de células planctônicas, mas são encontrados principalmente aderidos às superfícies bióticas ou abióticas na forma de microcolônias denominadas de biofilmes. Os microrganismos sésseis apresentam um estilo de vida totalmente diferente do planctônico, em razão da estrutura da EPS que é capaz de protegê-los (MEESILP; MESIL, 2019). Uma grande parte dos microrganismos presentes em alimentos, incluindo aqueles que causam deterioração e os patogênicos, pode formar biofilmes. A formação e o desenvolvimento de um biofilme são influenciados por diversos fatores, entre eles a estirpe microbiana, as propriedades da superfície do material e os parâmetros ambientais, como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes (CHAE *et al.*, 2006).

Os biofilmes conferem competências adicionais para os microrganismos, pois aumentam a aderência a superfícies, protegendo-os contra inibidores, dessecação, ataques do sistema imunológico do hospedeiro, antibióticos, além de aumentar a resistência a desinfetantes utilizados na indústria de alimentos (KHAN; LEE; KIM, 2016; O'TOOLE, 2003). A proteção ocasionada pela associação das células em biofilme é explicada por múltiplos fatores que atuam muitas vezes em conjunto, como alteração da estrutura, redução da taxa de difusão de compostos na matriz do biofilme, expressão gênica alterada e diminuição do tamanho das células (ELIAS; BANIN, 2012).

Biofilmes encontrados na natureza geralmente não são formados apenas por uma espécie e, apresentam duas ou mais espécies microbianas (YUAN *et al.*, 2019). Em ambientes com condições favoráveis para a formação de biofilme, a adesão a uma superfície por um único tipo de bactéria pode beneficiar a adesão de outros microrganismos nessa mesma superfície, aumentando a diversidade da contaminação microbiana e formando um biofilme multiespécies (BROOKS; FLINT, 2008). A estrutura e as atividades funcionais dos biofilmes multiespécies se devem, na maioria das vezes, às interações entre diferentes espécies de microrganismos (YANG *et al.*, 2011).

Equipamentos de processamento de alimentos, em especial de processamento de lácteos, apresentam uma variedade de condições favoráveis para a formação de biofilmes, como umidade, temperaturas adequadas para o crescimento de bactérias e presença de nutrientes (MARCHAND *et al.*, 2012). Falhas na higienização na indústria resultam no acúmulo de compostos orgânicos e inorgânicos em superfícies de contato, como o aço inoxidável, material frequentemente utilizado em linhas de processamento e armazenamento. O acúmulo desses compostos nas superfícies favorece a adesão bacteriana que resulta no desenvolvimento de biofilmes (GIAOURIS; SIMÕES, 2018).

Na indústria láctea, a presença de biofilmes cria sérios problemas por aumentar as taxas de corrosão de superfícies metálicas, diminuir a eficácia da transferência de calor durante os tratamentos térmicos, reduzir o fluxo nas tubulações, aumentar a resistência dos fluidos pelo atrito e reduzir a qualidade microbiológica dos produtos finais, o que leva a perdas econômicas (CHERIF-ANTAR *et al.*, 2016). Em equipamentos e utensílios das indústrias de laticínios os biofilmes são encontrados principalmente em dobras de tubos, juntas, superfícies planas, entre outros. Por isso, a limpeza eficiente dos equipamentos é essencial, pois as principais causas de contaminação do leite e seus derivados são a limpeza e desinfecção inadequadas dos equipamentos, tendo em vista que o leite é um alimento altamente rico em nutrientes, o que favorece a multiplicação microbiana (YUAN *et al.*, 2019). Os resíduos de leite, principalmente proteínas, persistentes em equipamentos e utensílios, juntamente com as EPS, resguardam ainda mais os microrganismos nos biofilmes, tornando-os mais resistentes aos protocolos de limpeza (JINDAL *et al.*, 2016).

As comunidades bacterianas encontradas em equipamentos da indústria de leite são compostas por microbiota variada, como bactérias Gram-positivas bem como Gram-negativas. Bactérias deterioradoras e, ou patogênicas foram isoladas de biofilmes em indústrias de alimentos, entre elas, espécies como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* (CHERIF-ANTAR *et al.*, 2016), leveduras e fungos (KSONTINI; KACHOURI; HAMDI, 2013), entre outros. Alta diversidade bacteriana foi detectada em biofilmes formados em ordenhadeiras mecânicas e incluíram representantes dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria (WEBER *et al.*,

2019). Oliveira *et al.* (2019) verificaram a predominância da classe Gammaproteobacteria e Bacilli em biofilmes formados em cupons de aço inoxidável na presença de leite cru. Wang *et al.* (2019) também demonstraram que a classe Gammaproteobacteria foi mais abundante nas amostras de biofilmes formados a partir de resíduos de leite nas superfícies externas dos equipamentos de armazenamento de leite, representando 72,96% do total, seguida por representantes da classe Bacilli (11,93%).

Espécies do gênero *Pseudomonas* spp. pertencem a classe das Gammaproteobacteria e são frequentemente reconhecidas pela capacidade de crescerem no leite cru durante o armazenamento refrigerado. Esses microrganismos são importantes causadores da deterioração do leite, aves, peixes, entre outros alimentos (DE JONGHE *et al.*, 2011; GE *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2017) e são capazes de formar biofilme multiespécies na parede de tanques de resfriamento de leite e dutos antes do processamento térmico (MEESILP *et al.*, 2019). Lauer Cruz; De Souza Da Motta (2019) observaram que *P. fluorescens* PL5.4, quando exposta à superfície do aço inoxidável, apresentou alta contagem no número de células aderidas a 7 °C não apresentando diferença significativa nos tempos entre 24 e 72 h. Isso confirma a sua preferência por adesão a temperaturas baixas e sua capacidade de manter a estrutura de biofilmes durante o armazenamento prolongado.

*S. aureus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli (NCBI, 2021) e é classificado entre os principais patógenos responsáveis por doenças de origem alimentar em todo o mundo (SCALLAN *et al.*, 2011). Sua associação como um dos principais agentes da mastite bovina, uma das doenças de maior custo na indústria de leite, faz este patógeno ser encontrado com frequência em leite cru. Além disso, *S. aureus* pode aderir e desenvolver biofilmes em superfícies de contato com alimentos, e comprometer a qualidade e segurança dos mesmos. Cherif-Antar *et al.* (2016) encontraram *S. aureus* em tubos de aço inoxidável em uma planta de processamento de leite antes e após o processo de pasteurização. Chagas *et al.* (2017) identificaram bactérias presentes em biofilmes em equipamentos de laticínios e 40% deles eram *S. aureus* classificados como fortes formadoras de biofilmes por testes em ágar vermelho congo e de adesão em microplacas de poliestireno.

Estirpes de *S. aureus* isoladas de leite pasteurizado na China apresentaram capacidade moderada ou forte de produção de biofilme (DAI *et al.*, 2019).

## 2.2 Composição de biofilmes bacterianos

A formação, a arquitetura e a função do biofilme é dependente de uma ampla variedade e combinação de características químicas, topográficas e físico-químicas, além de condições ambientais como pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura, proteínas, dinâmica de fluidos e fatores microbiológicos, como presença de espécies de bactérias Gram-negativas e, ou Gram-positivas, forma microbiana, estrutura, composição molecular, fase de crescimento, idade, presença de flagelos, pili e cápsulas (ALLEN; HABIMANA; CASEY, 2018; CAMPOCCIA; MONTANARO; ARCIOLA, 2013). Esses fatores associados às condições específicas de crescimento microbiano afetam, não só a produção e o rendimento da EPS, como também o seu tamanho e a composição química (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). A EPS do biofilme oferece uma estratégia de sobrevivência significativa a populações de bactérias (MARVASI; VISSCHER; CASILLAS MARTINEZ, 2010). A composição da EPS vem sendo intensamente estudada devido ao potencial biológico e tecnológico associado à estrutura do polímero e às suas propriedades reológicas (MANN; WOZNIAK, 2012; VIDHYALAKSHMI *et al.*, 2018).

Geralmente, carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos extracelulares (eDNA) são considerados os principais componentes dos biofilmes (ANDRE *et al.*, 2019; FLEMMING *et al.*, 2016; KASSINGER; VAN HOEK, 2020). A EPS do biofilme pode conter também glicolipídeos, ácido húmico e ácido urônico (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; KROLL *et al.*, 2014; MOJICA; ELSEY; COONEY, 2007). A celulose também é um componente comum em alguns biofilmes bacterianos e, apesar de frequentemente encontrada em associação com a parede celular de plantas, alguns microrganismos são capazes de sintetizar esse polímero que confere proteção a estresses ambientais (GUALDI *et al.*, 2008). De acordo com Choudhary; Singh; Agarwal (2020), os polissacarídeos são os principais constituintes dos biofilmes, os quais são neutros ou polianiônicos, no caso de bactérias Gram-negativas ou catiônicos, em Gram-positivas. As propriedades aniônicas dos polissacarídeos são atribuídas à presença de ácidos urônicos, tais como ácidos D-



glucurônico, D-galacturônico e manurônico ou piruvato ligados a grupos ceto, importantes para ligação com de polímeros quando associados com cátions divalentes, como cálcio e magnésio.

Em EPS produzida por *P. fluorescens*, Read e Costerton (1987) detectaram a presença de glicose, galactose e piruvato, enquanto Kives e Sanjos (2006) detectaram também polissacarídeos contendo ramnose, glicose e glucosamina. O Psl é um polissacarídeo comum nos biofilmes de *Pseudomonas* spp. que contém D-manose, D-glucose, e L-rhamnose e importante para a adesão inicial das células aos substratos bióticos e abióticos (MA *et al.*, 2009). Além disso, várias espécies de *Pseudomonas* produzem o polissacarídeo levano, o que também ajuda na colonização e persistência do biofilme (KASSINGER; VAN HOEK, 2020). Duas classes distintas de polissacarídeos de *Pseudomonas* apresentam função importante na constituição do biofilme. Os polissacarídeos capsulares sustentam características de polímeros protetores do exterior de uma ou mais células (MANN; WOZNIAK, 2012). Por outro lado, os polissacarídeos agregados proporcionam integridade estrutural e interação com os outros componentes da matriz (MANN; WOZNIAK, 2012).

A EPS de biofilmes de *S. aureus* é caracterizada pela presença de partículas de poli- $\beta$  (1,6) - *N*-acetil- D -glucosamina (PNAG), um polissacarídeo de superfície que contribui para o acúmulo do biofilme (CHRISTENSEN *et al.*, 1982; CRAMTON *et al.*, 1999). Oniciuc; Cerca; Nicolau (2016) afirmaram que as proteínas são essenciais para a estrutura de biofilmes formados por estirpes de *S. aureus* isoladas de fontes alimentares. O eDNA também é encontrado fazendo parte da composição do biofilme de *S. aureus* e é produzido por meio da autólise de uma subpopulação de células presentes no biofilme (THOMAS; HANCOCK, 2009).

### **2.3 Métodos para identificação da estrutura e composição do biofilme**

A investigação da estrutura e composição da EPS é de fundamental importância, uma vez que está relacionada com as atividades e funções biológicas do biofilme (KONO *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, diversas técnicas foram utilizadas para identificar e caracterizar biofilmes, incluindo suas estruturas moleculares. Métodos químicos e bioquímicos, ensaios genéticos com ácido nucleico, perfil de ácidos graxos e proteômica em geral são utilizados com esta

finalidade. Normalmente esses métodos necessitam de maior tempo de execução e trabalho mais árduo, além disso, demandam instrumentação cara, pessoal altamente treinado, possuem baixa reprodutibilidade e baixa especificidade (VERTES; HITCHINS; PHILLIPS, 2012).

Além dos métodos citados anteriormente, técnicas de imagem podem ser utilizadas para a investigação da estrutura de biofilmes e, atualmente são ferramentas essenciais de pesquisa utilizadas para analisar e entender estruturas e processos complexos em várias áreas da ciência. Em especial, nos campos da biologia e medicina, a imagem é considerada técnica indispensável para a análise não invasiva e tridimensional de amostras e objetos em diferentes escalas. As magnitudes analisadas podem variar de nanômetros (macromoléculas) a micrômetros (nível celular, agregados microbianos, biofilmes), inclusive centímetros (tapetes microbianos, tecidos, órgãos, corpo humano) (NEU *et al.*, 2010). A técnica de microscopia digital a laser (LSM), atualmente denominada microscopia confocal de varredura a laser, permite a análise estrutural de biofilmes. Essa técnica revelou as estruturas tridimensionais e internas gerais dos biofilmes, incluindo vasos e canais, resultando em um novo conceito de arquitetura de biofilme (NEU *et al.*, 2010). A microscopia de varredura também é uma técnica útil para a avaliação de biofilmes, pois apresenta vantagens de obter imagens nítidas e de alta resolução do biofilmes em três dimensões (WILSON *et al.*, 2018). A microscopia de epifluorescência é outra técnica bastante utilizada para a caracterização de biofilmes, e permite diferenciar células vivas de mortas com o uso de corantes específicos. O corante SYTO9 emite fluorescência verde, é capaz de penetrar em todas as células e é empregado para a contagem total de células, enquanto o iodeto de propídio, que emite fluorescência vermelha, penetra somente nas células com membranas citoplasmáticas danificadas (SHEN; STOJICIC; HAAPASALO, 2010). Por permitir a diferenciação entre bactérias com membranas citoplasmáticas intactas e danificadas, a microscopia de epifluorescência é bastante utilizada para diferenciar células vivas de mortas (SACHIDANANDHAM; GIN; POH, 2005).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para analisar a composição do biofilme como, dentre elas, a espectroscopia vibracional, como por exemplo a espectroscopia no infravermelho e espectroscopia Raman que fornecem "impressões digitais" de todo o organismo (GOODACRE *et al.*, 1998). A composição

da matriz pode também ser analisada por estas técnicas em amostras obtidas após a extração e purificação da EPS do biofilme, utilizando tratamentos físicos e, ou químicos (LU *et al.*, 2011).

A radiação infravermelha compreende o espectro eletromagnético de 0,78 a 1.000  $\mu\text{m}$  e é capaz de fornecer informações sobre o conteúdo químico da EPS e as diferentes proporções de polissacarídeos, proteínas e outros componentes da matriz. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica de fácil implementação, admite a detecção e identificação de moléculas orgânicas e o estudo da adesão microbiana e desenvolvimento do biofilme (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017). Moléculas orgânicas próximas à superfície externa do infravermelho absorvem a onda evanescente, o que resulta em vibrações moleculares, que causam alongamentos em substâncias químicas. Os grupos funcionais das moléculas absorvem energia em comprimentos de onda característicos, que alteram a intensidade ou a posição dos átomos adjacentes (RAE *et al.*, 2014). Então, o espectro de absorção resultante é particular dependendo da composição molecular da amostra. A reflexão total atenuada/ FT-IR é capaz de analisar biofilmes hidratados bem como biofilmes maduros e secos. No entanto, a desidratação do biofilme ocasiona diminuição da sua espessura e impede que o mesmo seja monitorado ao longo do tempo, pois, a desidratação promove a destruição da amostra (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017). A espectroscopia Raman, que será tratada com detalhes no próximo item, permite obter a composição das amostras a partir da emissão de um feixe de luz sobre a amostra e posterior análise da luz emitida pela amostra, chamada de espalhamento Raman (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017).

Para processar os dados de espectroscopia no infravermelho e Raman são necessárias análises estatísticas para que pequenas diferenças espectrais de uma amostra biológica possam ser distinguidas (LU *et al.*, 2011). Para isso, utiliza-se a quimiometria, uma análise estatística multivariada que reduz as informações multidimensionais a fim de preservar as informações mais acentuadas e representativas, denominadas de componentes principais da amostra (LU *et al.*, 2011).

A espectroscopia Raman demonstrou grande potencial para diferenciar culturas de *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus epidermidis* formadoras e não

formadoras de biofilmes e pode se tornar uma ferramenta de diagnóstico útil no futuro (REBROŠOVÁ *et al.*, 2017). Liu *et al.* (2020) consideraram a espectroscopia Raman e fatoração de matriz não negativa (NMF) ferramentas versáteis para a caracterização de biofilmes e a aplicaram para investigar a organização espaço-temporal e presença de biomoléculas em biofilmes de *Escherichia coli*. Esses autores analisaram também as mudanças estruturais ao longo do desenvolvimento dos biofilmes e obtiveram informações químicas e espaciais sobre a matriz dos mesmos.

## 2.4 Espectroscopia Raman

Na espectroscopia Raman, vibrações que alteram a polarização das moléculas são visíveis no espectro. As vibrações moleculares são excitadas por meio da absorção da luz e da dispersão inelástica da luz. Os fótons que são dispersos emitem uma quantidade de energia que corresponde a vibrações específicas de cada molécula (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017). A espectroscopia Raman mede o espalhamento inelástico da radiação da luz monocromática, compondo um deslocamento espectral, chamado deslocamento "Raman", que resulta da interação da luz com os elétrons em torno de ligações moleculares (HUANG *et al.*, 2010). Quando a frequência da luz que dispersa é inferior à frequência da luz incidida, a dispersão é chamada de dispersão de espalhamento Stokes e, quando a frequência da luz dispersa for superior a frequência da luz incidida, a dispersão é nomeada como espalhamento anti-Stokes. Os diferentes princípios físicos de ambos os espalhamentos induzem a diferentes intensidades da mesma vibração (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017).

A espectroscopia Raman necessita de mudanças na polarizabilidade de grupos funcionais à medida que os átomos vibram, deste modo, grupos não-polares, como C-C e S-S, apresentam bandas Raman intensas (HUANG *et al.*, 2010). A vibração de alongamento OH é altamente pronunciado nos espectros de infravermelho, mas fracamente visível nos espectros Raman, o que caracteriza a espectroscopia Raman a mais adequada para a análise de amostras contendo água, que é o caso dos biofilmes (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017). Porém, as informações fornecidas pela espectroscopia Raman podem ser complementares à

espectroscopia no infravermelho e o acoplamento dessas técnicas é geralmente vantajoso (LU *et al.*, 2011).

Outra maneira de aumentar a intensidade dos espectros Raman é a conexão do mesmo a um microscópio confocal e, essa integração, permite análises espacialmente precisas, devido à radiação dispersa ser coletada da luz bem próxima ao plano focal do microscópio. A espectroscopia Raman permite a detecção de bactérias em estado planctônico ou em um biofilme, é capaz de diferenciar os componentes da parede celular da bactéria e monitorar resposta celular em razão de estresses ambientais (HUANG *et al.*, 2010).

A espectroscopia Raman é uma técnica que apresenta diversas vantagens como a caracterização não destrutiva da amostra, geração de imagens de biofilmes quando associado ao uso do microscópio, além de fornecer espectros vibracionais de impressões digitais de células e dos componentes celulares, como de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios. A partir das informações da espectroscopia Raman, obtêm-se dados da composição químicas da matriz polimérica de biofilmes, sem a necessidade do preparo da amostra, como secar ou corar, antes da análise (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017). Os espectros Raman também podem ser utilizados para identificar e discriminar microrganismos a nível de estirpe (BEIER; BERGER, 2009; RAE *et al.*, 2014)

Uma desvantagem significativa da análise utilizando a técnica espectroscopia Raman é a baixa eficiência quântica do efeito Raman (normalmente de  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$ ), o que leva a sensibilidade limitada ao aumento do tempo de análise de amostras microbiológicas, que na maioria das vezes, possuem pouca biomassa por ponto de medição. No entanto, existem maneiras de aumentar a intensidade dos espectros utilizando a fixação de estruturas metálicas nanométricas, como íons de prata ou ouro. Este aperfeiçoamento é conhecido como Espalhamento Raman de superfície aprimorada (SERS) (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017).

Apesar de ainda ser pouco explorada para a análise de biofilmes, a técnica permite a obtenção de informações importantes. Em razão da maior resolução espacial, é possível a análise da heterogeneidade da amostra em maior detalhe (IVLEVA; KUBRYK; NIESSNER, 2017).

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Industrial e Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAP), ambos do Departamento de Microbiologia e no Laboratório de Espectroscopia Raman, do Departamento de Física, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. As instalações do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV também foram utilizadas.

#### 3.1 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas neste estudo, as espécies *B. agrestis*, *P. fluorescens*, *R. inusitata*, *S. aureus*, *Lactococcus laudensis* e *Lactococcus garviae* isoladas de biofilmes multiespécies produzidos na presença de leite cru integral, no Laboratório de Microbiologia Industrial. Os isolados obtidos de biofilmes formados em leite cru pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Industrial do BIOAGRO, UFV. Os isolados foram mantidos em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia, Índia) adicionado de 20% de glicerol a -20 °C. Antes de cada experimento, as culturas foram descongeladas e ativadas por duas vezes consecutivas em caldo Triptcaseína e Soja (TSB, Sigma-Aldrich, EUA), a 30 °C.

#### 3.2 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno

A formação de biofilmes de espécie única e de combinações das seis espécies estudadas foi feita na presença de leite em pó integral reconstituído a 1% (LDR 1%) e leite em pó integral reconstituído a 10% (LDR 10%) em água esterilizada. O leite em pó foi diluído a 1% a fim de simular os resíduos de leite nos equipamentos da indústria de lácteos. A formação de biofilme foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 poços de acordo com Fabres-Klein *et al.* (2015), com modificações. Os isolados bacterianos foram inoculados em TSB, incubados a 30 °C por 12 a 16 h, e a densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) foi ajustada para 0,1. Posteriormente, 2  $\mu$ L do inóculo (quando em biofilme multiespécies foram adicionadas quantidades iguais de cada microrganismo, homogeneizado e depois foram coletados 2  $\mu$ L do inóculo) foi adicionado a 200  $\mu$ L de LDR 1% e LDR 10% e a microplaca incubada a 7 °C (temperatura de refrigeração) por 10 dias e a 25 °C

(temperatura média ambiente) por 48 h, sem agitação. A cada dois dias de incubação a 7 °C, o leite foi removido gentilmente e os poços foram novamente preenchidos com 200 µL de LDR 1% ou 10% adicionados do inóculo padronizado. Após o período de incubação, o LDR foi descartado e os poços de cada placa foram lavados suavemente, por três vezes, com 200 µL de tampão fosfato-salina (PBS) esterilizado. Seguiu-se a secagem da microplaca a 37 °C por 20 min e então, 200 µL de cristal violeta a 1% foram adicionados a cada poço. Após 15 min de coloração, cada poço foi lavado novamente por três vezes com 200 µL de PBS esterilizado, seguido de secagem a 37 °C por 20 min. O cristal violeta retido pelas células do biofilme foi extraído pela adição de 200 µL de etanol 92,8% em cada poço. A alíquota de 200 µL foi removida de cada poço e transferida para uma nova microplaca, para leitura da absorbância a 590 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Finlândia). Os experimentos foram realizados em três repetições e as espécies, as combinações entre elas e a melhor temperatura que resultaram na maior formação de biofilme na presença de LDR 1% ou 10% foram escolhidas para formação de biofilme em cupons de aço inoxidável. Os isolados foram caracterizados com base em seu potencial de formação de biofilme em não aderente, fracamente, moderadamente ou fortemente aderente, usando o método de Stepanović *et al.* (2000), como apresentado:

$$DO_{\text{Corte}} = DO_{\text{média de controle negativo}} + [3 \times \text{desvio padrão da } DO_{\text{do controle negativo}}]$$

$$DO \leq DO_{\text{corte}} = \text{não aderente}$$

$$DO_{\text{Corte}} < DO \leq 2 \times DO_{\text{Corte}} = \text{fracamente aderente}$$

$$2 \times DO_{\text{Corte}} < DO \leq 4 \times DO_{\text{Corte}} = \text{moderadamente aderente}$$

$$DO > 4 \times DO_{\text{Corte}} = \text{fortemente aderente}$$

### 3.3 Formação de biofilmes em aço inoxidável

Os biofilmes foram formados em cupons de aço inoxidável (AISI #304), na dimensão de 1 cm<sup>2</sup> e, para a quantificação de células aderidas, foram utilizados cupons na dimensão de 2 cm<sup>2</sup>. A limpeza e esterilização dos cupons foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Andrade; Bridgeman; Zottola (1998). O cultivo dos isolados *P. fluorescens* e *S. aureus*, escolhidos para a

formação do biofilme multiespécies em cupons de aço inoxidável foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL conforme Oliveira *et al.* (2019). Em cada frasco Erlenmeyer, foi adicionado LDR 1% e LDR 10%. O inóculo consistiu de  $10^6$  UFC/ mL de culturas pré-ativadas de *P. fluorescens* e *S. aureus*. Nove cupons de aço inoxidável, suspensos por um fio à borda do frasco, foram imersos nas amostras de LDR 1% e LDR 10%. Os frascos foram incubados em BOD a  $7 \pm 1$  °C por até 240 h e o substrato foi trocado a cada dois dias, com os respectivos inóculos, sendo assim, os tempos de amostragem foram (T0, T2, T4, T6, T8 e T10). Em cada tempo de amostragem, um cupom foi retirado para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/cm<sup>2</sup>), pela técnica de plaqueamento em superfície em meios diferenciais. O experimento foi realizado em duplicata e, no 5° dia de incubação, um cupom foi retirado para análise de microscopia de epifluorescência e no 10° dia de incubação, foram retirados um cupom para análise de microscopia de epifluorescência, um para análise de microscopia confocal de varredura e um para análise de espectroscopia Raman. Todas as análises foram realizadas em três repetições.

### **3.4 Quantificação da microbiota aderida ao cupom de aço inoxidável**

Para quantificação das células sésseis, os cupons foram retirados e lavados com tampão PBS esterilizado para retirada de células planctônicas (RYU; BEUCHAT, 2008). Em seguida, os cupons foram colocados em tubo de ensaio contendo 15 mL de PBS e submetidos à ação de ultrassom (Vibra Cell, Newtown, EUA) em modo contínuo e operante (130 W 20 kHz) por 30 s, para remoção das células sésseis. Essa suspensão foi homogeneizada e uma alíquota retirada para o preparo de diluições decimais seriadas, que foram plaqueadas pela técnica de espalhamento em superfície (*Spread Plate*). Para a contagem de *P. fluorescens* foi utilizado o Ágar MacConkey (Kasvi, Brasil) que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas pela presença de sais biliares e cristal violeta. A contagem de *S. aureus* foi feita em Ágar Sal Manitol com concentração de 7,5% de cloreto de sódio que resulta em inibição parcial ou completa de outros organismos bacterianos que não os estafilococos. A contagem de colônias foi feita em contador de colônias, após incubação por 24 a 48 h a 30 °C.



### **3.5 Observação do biofilme por microscopia de epifluorescência**

Nos tempos 5 e 10 dias de incubação a 7 °C, os biofilmes formados em cupons de aço inoxidável foram observados em microscópio de epifluorescência (Thermo Fisher, modelo EVOS M5000, EUA). Os cupons foram retirados e lavados com PBS para a remoção das células não aderidas. Posteriormente, os cupons foram corados com os reagentes do kit *Bacteria Cell Viability* (Invitrogen, Suíça) durante 15 a 20 min protegidos da luz, e então, foram lavados com PBS, para serem observados em microscópio de epifluorescência com aumento de 60 vezes.

### **3.6 Observação do biofilme por microscopia eletrônica de varredura**

Os cupons de aço inoxidável foram removidos do meio de cultivo após 10 dias a 7 °C e lavados com tampão PBS. A fixação foi feita por 1 a 2 h em temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído em 0,05 M de tampão PBS. Em seguida, foram lavados com tampão PBS seis vezes por períodos de 10 min cada, seguido por etapas de desidratação com 30, 50, 70, 80, 95, e 100% de etanol, cada uma por 10 min e a sequência repetida por três vezes. Posteriormente, a etapa de secagem foi realizada no ponto crítico no Bal-Tec CPD 30 (Balzers, Liechtenstein), com metalização em Sputter Coater SCD 010 (Quorum Q150RS) e observação em microscópio eletrônico de varredura com aumento de 1000 vezes (JEOL, Japão).

### **3.7 Espectroscopia Raman**

As informações da composição dos biofilmes em cupons de aço inoxidável foram adquiridas em microscópio Raman (Renishaw, Inglaterra). A medição Raman foi realizada em um ambiente escuro com uma potência de varredura de 20 mW a 785 nm e um tempo de varredura de 10 s por 10 vezes. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 500  $\text{cm}^{-1}$  a 1500  $\text{cm}^{-1}$  C. Inicialmente, os biofilmes formados em cupons de aço inoxidável foram secos ao ar e observados em diversas regiões para obter informações sobre a composição química e homogeneidade dos biofilmes. As imagens foram obtidas em três repetições.

### **3.8 Análise dos espectros**

Os espectros obtidos na espectroscopia Raman foram analisados utilizando o *software* OriginLab. Os espectros passaram por tratamentos matemáticos visando remover o efeito da fluorescência e evidenciar os picos Raman. Para isso, foram subtraídas as linhas de base utilizando uma reta.

### **3.9 Análises estatísticas**

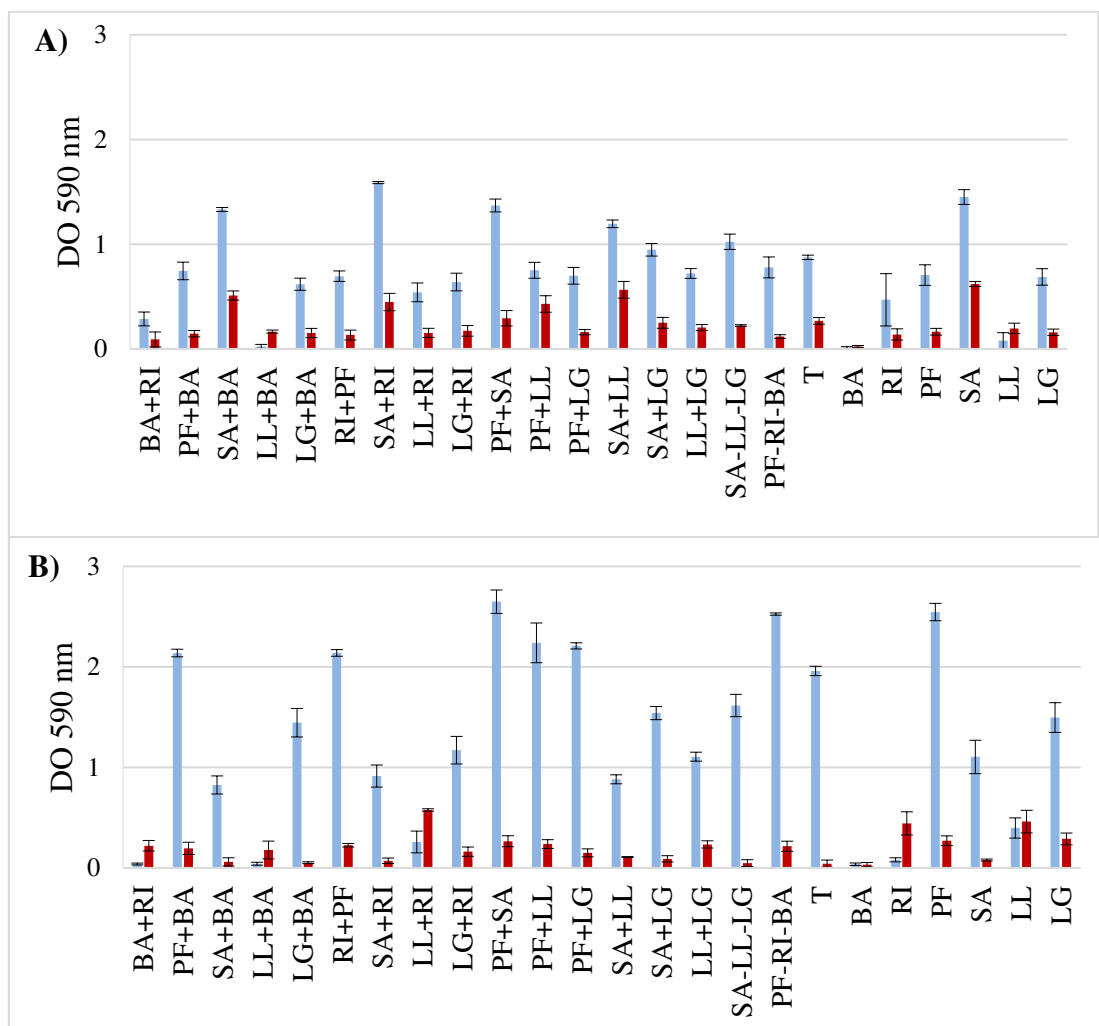
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R. Os dados do número de células (UFC/g) foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças significativas entre a quantificação microbiana foram avaliadas utilizando o teste de Tukey a um nível de significância de  $P < 0,05$ .

## 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Biofilmes formados em microplacas de poliestireno

Seis espécies bacterianas isoladas de biofilmes multiespécies formados na presença de leite cru foram avaliadas quanto a capacidade de formar biofilme em LDR 1% e LDR 10%, em temperaturas de 7 °C e 25 °C, e os resultados estão apresentados na Figura 1 (A e B).

**Figura 1-** Adesão dos biofilmes individuais e multiespécie formados em microplacas de poliestireno a 7 °C por 10 dias (Azul) e 25 °C por 48 h (Vermelho) em LDR 1% (A) e LDR 10% (B). BA, *B. agrestis*; RI, *R. inusitata*; PF, *P. fluorescens*; LL, *L. laudensis*; LG, *L. garviae*; SA, *S. aureus* e T, a mistura dos seis isolados utilizados. As diferenças no potencial de formação de biofilme entre os isolados foram determinadas usando ANOVA e o teste de Tukey ( $P < 0,05$ )



Os menores valores de DO<sub>590</sub> foram observados, na maioria das vezes, quando as culturas bacterianas foram cultivadas em LDR 1% (Figura 1 A), independente da temperatura de incubação, e indicam que a proporção de nutrientes influenciou na formação de biofilmes. É também evidente a tendência de maior formação de biofilme a 7 °C, independente do meio de cultivo, mesmo por *S. aureus*, que não é reconhecida como bactéria psicrófila (Figura 1 A e B). O efeito de baixas temperaturas na formação de biofilmes foi considerado por outros autores e parece ser estimulador na adesão microbiana. Rossi *et al.* (2016) observaram que a temperatura de 10 °C contribuiu expressivamente para a formação do biofilme por diferentes estirpes de *P. fluorescens* em caldo TSB quando comparado com a temperatura de 30 °C. Xu *et al.* (2017) selecionaram 42 estirpes de *P. fluorescens* para avaliar a formação de biofilme em leite UHT nas temperaturas de 4 °C e 30 °C e verificaram que aproximadamente, 88,1% dos isolados de *P. fluorescens* (37/42) formaram biofilme após incubação a 4 °C e 66,7% (28/42) formaram biofilme após incubação a 30 °C. Esses autores concluíram que isolados de *P. fluorescens* apresentam amplo potencial de formação de biofilme em leite armazenado sob refrigeração.

Mesmo não sendo considerado um microrganismo psicrófilo, *S. aureus* esteve presente nas combinações de bactérias que resultaram em maior formação de biofilmes a 7 °C em LDR 1% (Figura 1 A). Os valores de DO<sub>590</sub> das combinações de *P. fluorescens* + *S. aureus*; *S. aureus* + *R. inusitata*; *S. aureus* + *B. agrestis* e *S. aureus* + *L. laudensis* não apresentaram diferença significativa entre si ( $P > 0,05$ ) e foram considerados altamente aderentes. *S. aureus* se destacou também como formador de biofilme a 7 °C em LDR 1% em cultura pura (Figura 1 A). A capacidade de *S. aureus* formar biofilmes em baixas temperaturas foi relatada por Valero *et al.* (2009), que verificaram a ausência de crescimento em temperaturas de 4 a 6 °C, mas foi possível constatar o crescimento na temperatura de 8 °C e em valores ótimos de pH e A<sub>w</sub>. Entretanto, quando o cultivo foi em LDR 10% (Figura 1 B), a bactéria predominante na maioria das combinações que resultou em maior formação de biofilmes a 7 °C foi *P. fluorescens* (Figura 1 B).

O potencial de formação de biofilmes destas espécies bacterianas foi determinado de acordo com os critérios sugeridos por Stepanović *et al.* (2000) e apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1- Potencial de formação de biofilme** Adesão dos biofilmes individuais e multiespécie formados em microplacas de poliestireno a 7 °C por 10 dias e 25 °C por 48 h em LDR 1% e LDR 10% de acordo com Stepanović *et al.* (2000). BA, *B. agrestis*; RI, *R. inusitata*; PF, *P. fluorescens*; LL, *L. laudensis*; LG, *L. garviae*; SA, *S. aureus* e T, a mistura dos seis isolados utilizados.

Combinações das espécies	LDR 1%		LDR 10%	
	7 °C	25 °C	7 °C	25 °C
BA+RI	++	-	-	+
PF+BA	+++	+	+++	+
SA+BA	+++	+++	+++	-
LL+BA	-	+	-	+
LG+BA	+++	+	++	-
RI+PF	+++	+	++	+
SA+RI	+++	+++	+++	-
LL+RI	++	+	+++	++
LG+RI	++	+	+++	+
PF+SA	+++	++	+++	+
PF+LL	+++	++	+++	+
PF+LG	+++	+	++	-
SA+LL	+++	+++	+++	-
SA+LG	+++	++	+++	-
LL+LG	+++	+	+++	+
SA-LL-LG	+++	+	+++	+
PF-RI-BA	+++	+	+++	+
T	+++	++	+++	-
BA	-	-	-	-
RI	+++	+	++	++
PF	+++	+	+++	+
SA	+++	+++	+++	-
LL	-	+	-	++
LG	+++	+	++	+

Classificação (-) Sem aderência, (+) Fraca aderência (++) Moderada aderência (+++) Alta aderência.

Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que *S. aureus* e *P. fluorescens* se destacaram como melhores formadores de biofilmes nas duas condições de LDR avaliadas e que a temperatura de 7 °C favoreceu a formação de biofilmes por estas bactérias em superfície de poliestireno. Portanto, estes dois

isolados bacterianos e a temperatura de refrigeração foram selecionados para a continuidade do estudo.

## 4.2 Biofilmes formados em cupons de aço inoxidável

### 4.2.1 Quantificação de células aderidas ao cupom de aço inoxidável

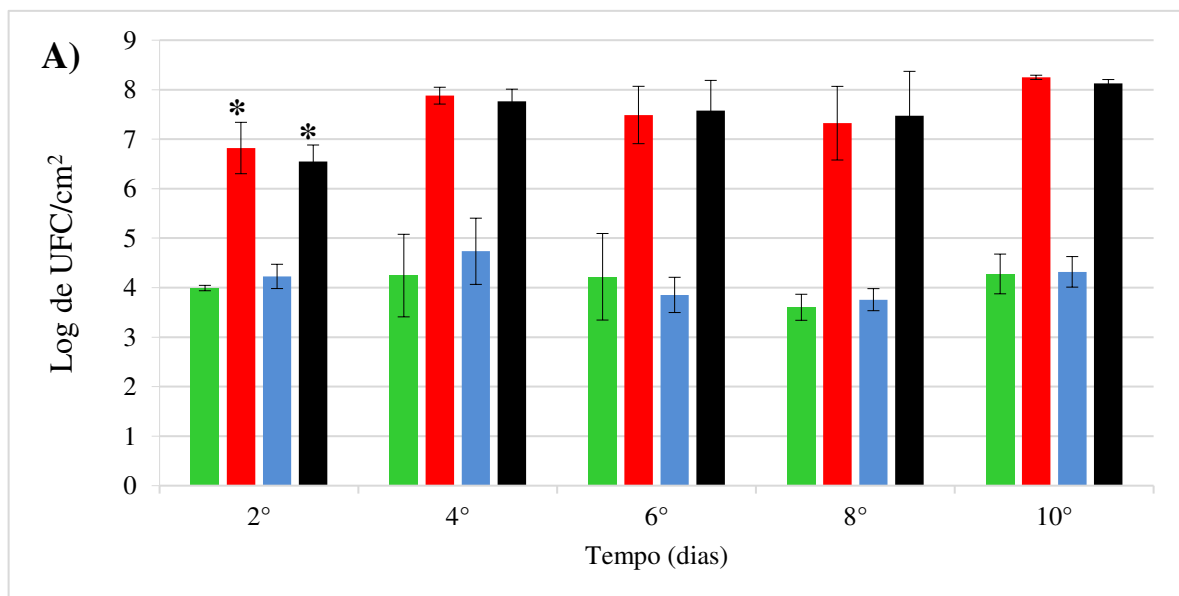
A contagem de células aderidas aos cupons de aço inoxidável foi realizada a cada dois dias e os resultados estão apresentados na Figura 2 (A e B). O número de células de *S. aureus* aderidas em biofilme formado quando em cultura pura não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) ao longo dos 10 dias de incubação a 7 °C, independente do meio de cultivo utilizado e se manteve em torno de  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> (Figura 2 A). Da Silva Meira *et al.* (2012) constataram que número de células aderidas de três estirpes de *S. aureus* às superfícies de aço inoxidável e de polipropileno se manteve em torno de  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> ao longo de 72 horas de incubação a 7 °C e 28 °C. Estes autores verificaram que a estirpe *S. aureus* S28 apresentou os maiores números ( $P < 0,05$ ) de células aderidas em polipropileno a 28 °C e em aço inoxidável a 7 °C.

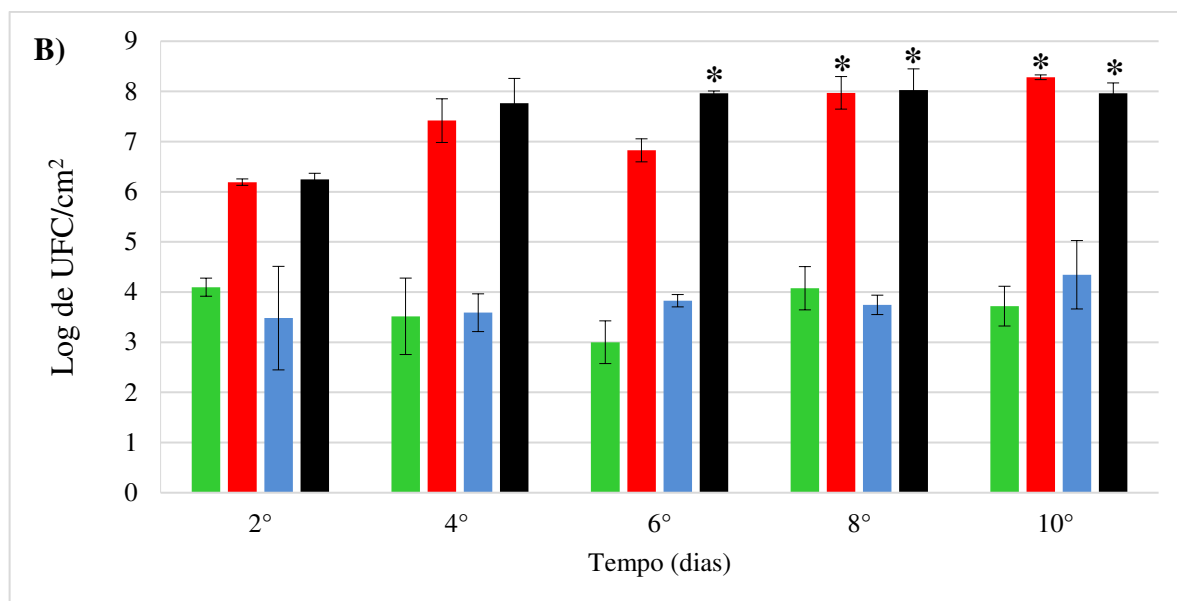
A população de células de *P. fluorescens* em biofilme individual em LDR 1% não diferiu ( $P > 0,05$ ) a partir do 4º dia de incubação ( $P < 0,05$ ) (Figura 2 A). Entretanto, ao longo do período de incubação em LDR 10%, houve o aumento no número de células de *P. fluorescens* aderidas e diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas no 8º e 10º dia de incubação (Figura 2 B). O tempo e as temperaturas de incubação e as superfícies avaliadas influenciam na produção de biofilmes. Populações elevadas de 9,1 log UFC/cm<sup>2</sup> de *P. fluorescens* em superfície de aço inoxidável foram registradas por Lauer Cruz; De Souza Da Motta (2019) após 24 h de incubação em caldo TSB a 7 °C. Os resultados obtidos por Lauer Cruz; De Souza Da Motta (2019) reforçam os resultados obtidos no presente trabalho, pois demonstraram que espécies de *P. fluorescens* foram capazes de produzir biofilmes a 7 °C.

Os resultados do número de células das espécies usadas em co-cultivo demonstram que a presença de *P. fluorescens* não inibiu a adesão e formação de biofilme por *S. aureus*. Abriat *et al.* (2019) também verificaram que *P. fluorescens* não exerceu diminuição significativa na contagem de células de *Bacillus licheniformis* quando em co-cultivo, constatando não haver efeito bactericida nem

inibitório. Entretanto, quando avaliada a formação de biofilme de *S. aureus* em co-cultivo com *P. aeruginosa*, em caldo BHI, *P. aeruginosa* dominou *S. aureus* na fase de pré-biofilme e em consórcios de biofilme (MIRANI *et al.*, 2018). Uma co-cultura de *S. aureus* com *E. coli* revelou o domínio de *E. coli* em estágio de pré-biofilme, mas em consórcios de biofilme, *S. aureus* superou *E. coli* e ocupou mais espaço (MIRANI *et al.*, 2018). Viana *et al.* (2018) analisaram o biofilme multiespécies formado de *S. aureus* e *E. coli* em leite nas temperaturas de 25 °C e 30 °C e não constataram o crescimento de *S. aureus* após 24 ou 48 h, evidenciando a dominância de *E. coli* sobre *S. aureus* nesse substrato.

**Figura 2-** Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/cm<sup>2</sup>) de *S. aureus* (Verde); *P. fluorescens* (Vermelho) em biofilmes de espécie única e de *S. aureus* (Azul); *P. fluorescens* (Preto) em biofilmes multiespécies. Os biofilmes foram formados em cupons de aço inoxidável imersos em amostras de LDR 1% (A) LDR 10% (B) durante incubação a 7 °C por 10 dias. \*  $P < 0,05$ .





A população de *P. fluorescens* em biofilme multiespécies com *S. aureus* aumentou ao longo de 10 dias de incubação em LDR 1% e LDR 10%, com variações significativas ( $P > 0,05$ ) no 2º dia em LDR 1% e a partir do 6º dia de incubação em LDR 10%. A presença de *S. aureus* não exerceu efeito antagônico, pois o número de células de *P. fluorescens* aderidas aos biofilmes em LDR 1% e LDR 10% se manteve semelhante ( $P > 0,05$ ) ao encontrado no biofilme de espécie única (Figura 2 A e B). Puga; Orgaz; Sanjose (2016) relataram que, em biofilme multiespécies de *P. fluorescens* e *L. monocytogenes*, o volume do biofilme foi reduzido quando comparado ao biofilme individual de cada espécie analisada.

Foi analisado também se existe dependência entre a concentração do LDR 1% e 10% e a espécie utilizada ao longo do período de incubação. No 2º, 8º e 10º dias de incubação a 7 °C a dependência entre os dois fatores é não significativa, ou seja, um fator não depende do outro, ou seja, ao longo de determinados tempos a concentração do leite não influenciou a formação de biofilme na espécie utilizada. Além disso, verificou-se que não há diferença significativa entre o LDR 1% e LDR 10% nestes tempos de incubação, portanto, a concentração de LDR nos 2º, 8º e 10º dia não diferiram quanto a formação de biofilme. No 4º dia de incubação, a interação entre os fatores LDR e espécie utilizadas foi não significativa ( $P > 0,05$ ), porém quando analisado individualmente, o fator LDR interferiu no crescimento bacteriano, sendo que maior número de células aderidas ( $P < 0,05$ ) foi observado em LDR 1%. No 6º dia de incubação foi constatada interação significativa, demonstrando assim a



dependência entre os dois fatores. Também foi possível verificar neste tempo de incubação que os biofilmes individuais e mistos apresentaram maior contagem de células quando formados no LDR 1% demonstrando que a quantidade de células aderidas no 6° dia, foi influenciada pela concentração de LDR. Estes resultados diferem dos observados quando o método usado para detecção de biofilmes foi o método de microplacas de poliestireno e coloração com cristal violeta, que indicou maior formação de biofilme na presença de LDR 10% (Figura 1 A e B). Deve-se considerar que as superfícies usadas e os métodos de detecção dos biofilmes foram diferentes nos dois experimentos. De acordo com Lourenço *et al.* (2012) uma vez que a formação do biofilme é influenciada pelo material da superfície, a extrapolação dos resultados de métodos de alto rendimento usando microplacas para superfícies mais industrialmente relevantes deve ser realizada com cautela. O corante cristal de violeta usado para detecção de biofilmes em microplacas de poliestireno é um corante básico, que se liga a moléculas de superfície carregadas negativamente e a polissacarídeos na matriz extracelular (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Portanto, tanto células vivas e mortas, bem como a matriz polimérica do biofilme são coradas. Por outro lado, a técnica de contagem de colônias formadas por células do biofilme formado no cupom de aço inoxidável determina apenas células viáveis. A remoção de células por ultrassom não é completa e, além disso, a desintegração dos aglomerados celulares pode ser incompleta e resultar em subestimação da população de células sésseis.

O maior número de células viáveis aderidas ao cupom de aço inoxidável observado no substrato diluído, ou seja, LDR 1%, pode ser em razão do estresse nutricional provocado pela menor concentração de nutrientes. A adesão e a permanência em biofilmes são estratégias usadas por microrganismos para superar condições de estresses, pois em comunidade, as células possuem maiores chances de sobrevivência quando se encontram em situação de escassez de nutrientes, desidratação, alterações de pH, presença de bacteriófagos ou predadores (READ; COSTERTON, 1987). A matriz polimérica que envolve a estrutura, além de fornecer suporte estrutural, armazena nutrientes do ambiente, retém água através de ligações de hidrogênio e fornece proteção para as células (FLEMMING *et al.*, 2016).

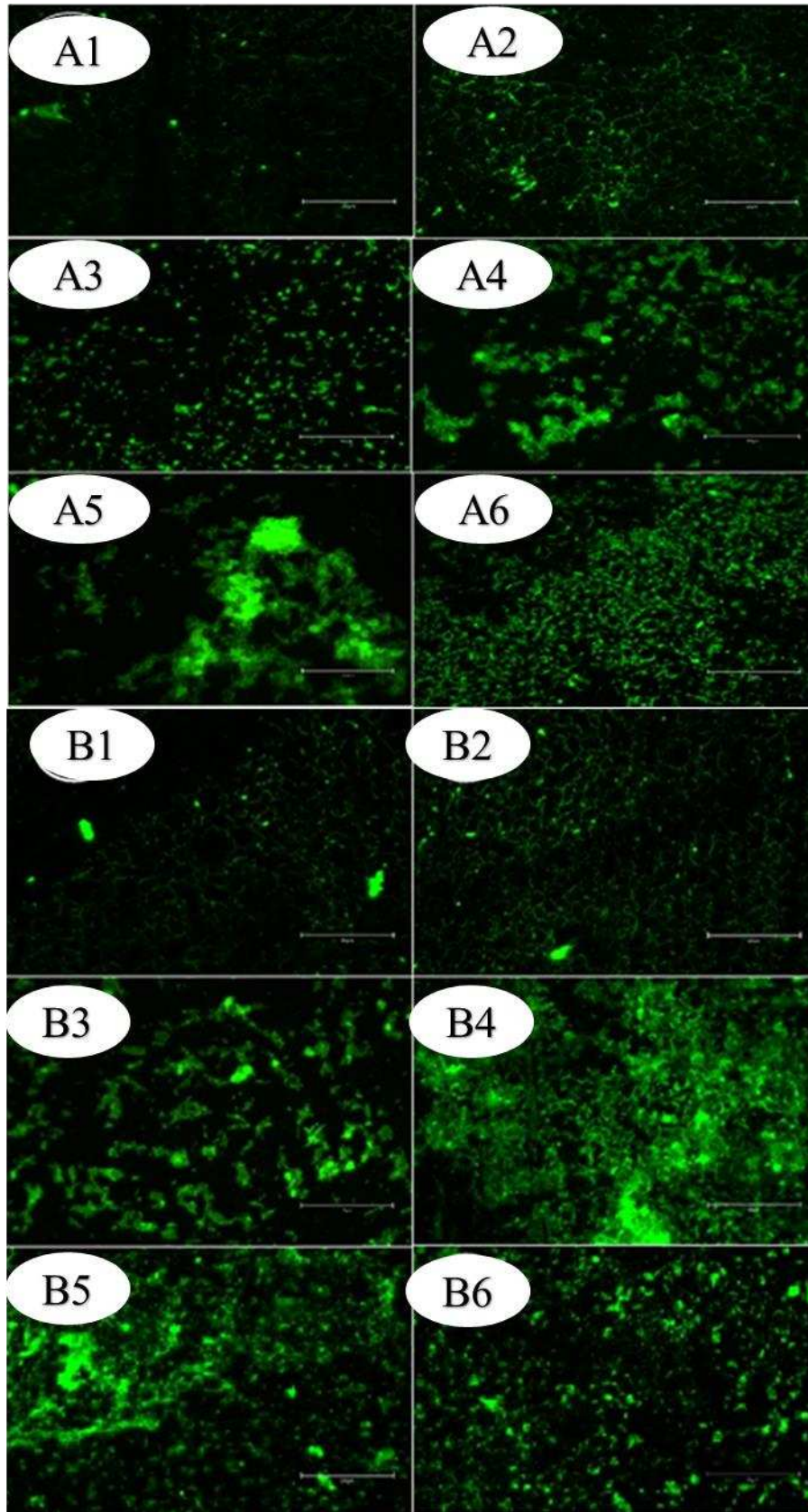
#### 4.2.2 Estrutura dos biofilmes avaliados por microscopia de epifluorescência e microscopia eletrônica de varredura

A observação dos biofilmes formados em cupons de aço inoxidável em microscopia de epifluorescência permitiu constatar a presença de aglomerados celulares que podem ser considerados biofilmes e estão apresentados na Figura 3.

**Figura 3-** Imagens de microscopia de epifluorescência dos biofilmes no 5<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia de incubação a 7 °C. A) Biofilmes formados em LDR 1%: A1 e A2, Biofilme individual de *S. aureus*; A3 e A4, Biofilme individual de *P. fluorescens*; A5 e A6, Biofilme multiespécies de *S. aureus* e *P. fluorescens* B) Biofilmes em LDR 10%: B1 e B2, Biofilme individual de *S. aureus*; B3 e B4, Biofilme individual de *P. fluorescens*; B5 e B6, Biofilme multiespécies de *S. aureus* e *P. fluorescens*. Escala: 50 µm.

5° dia

10° dia



O uso de corantes específicos nas preparações para observação em microscopia de epifluorescência permite avaliar a viabilidade celular a partir da coloração das células. No presente estudo, foi possível observar a predominância de células com fluorescência verde, característica de células vivas, o que pode estar relacionado com a troca de substrato e inóculo que foi feita a cada dois dias de incubação.

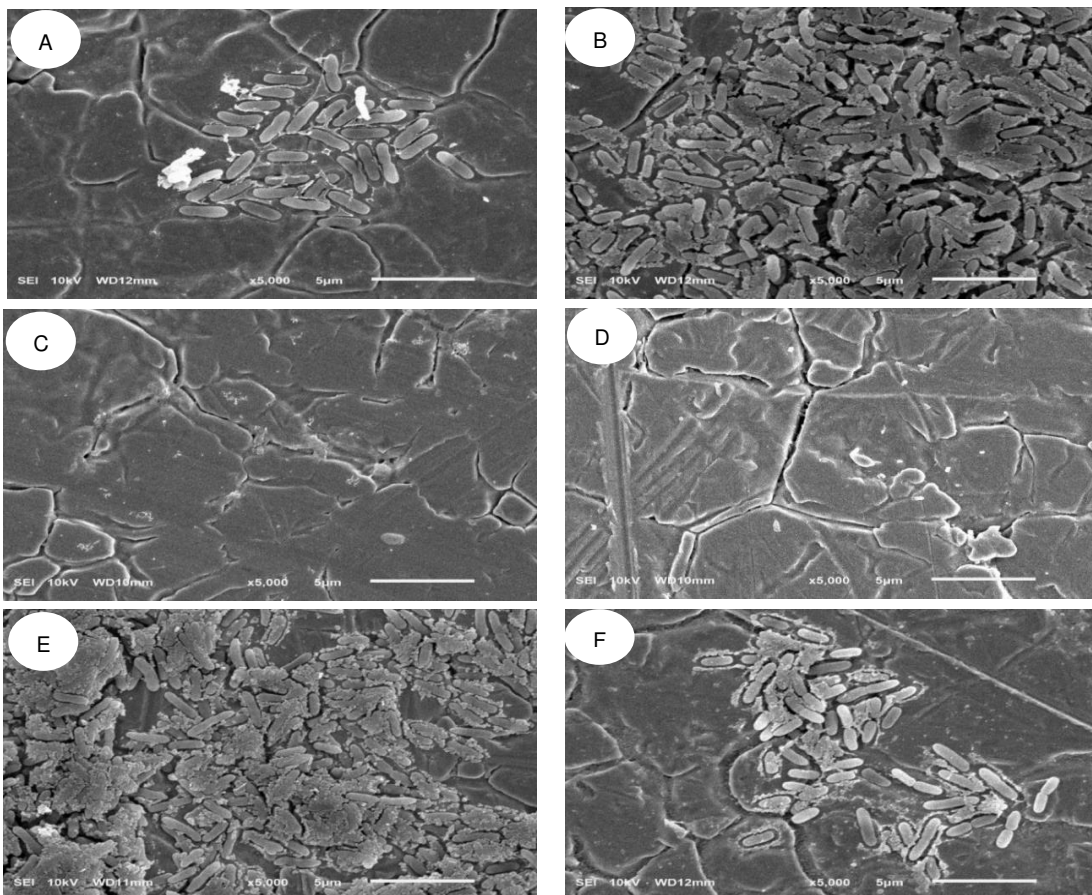
Foi possível observar nas imagens obtidas no 5º e no 10º dia de incubação que biofilmes formados por *S. aureus* apresentaram poucos aglomerados celulares, o que permite associar os resultados das imagens de epifluorescência com a quantificação de células aderidas, quando *S. aureus* apresentou menor número de células e, conseqüentemente menor formação de biofilme, ou até mesmo a não formação de biofilme. Os resultados das imagens de microscopia de epifluorescência corroboram os resultados da quantificação de células aderidas, demonstrando que os biofilmes formados por *P. fluorescens* apresentaram maior número de células do que os biofilmes individuais de *S. aureus*.

Outra técnica microscópica utilizada para observação dos biofilmes formados em cupons de aço inoxidável foi a microscopia eletrônica de varredura (Figura 4). As observações foram feitas no décimo dia de incubação e permitiram observar células aderidas e a organização dos biofilmes formados.

A observação dos cupons de aço inoxidável mantidos na cultura pura de *S. aureus* não registrou a presença de aglomerados característicos de biofilmes nem tão pouco de material que sugerisse a presença de EPS (Figura 4 C e D). Algumas células isoladas foram observadas o que pode indicar a etapa de adesão sem a subsequente formação de biofilme, isso pode ser caracterizado como a não formação ou pouca formação de biofilme por *S. aureus*. Embora o número de células de *P. fluorescens* aderidas ao cupom de aço inoxidável tenha sido semelhante no 10º dia de incubação em LDR 1% e LDR 10% (Figura 4 A e B), as imagens distinguem aglomerados maiores e com presença de EPS no biofilme individual formado em LDR 10% (Figura 4 B). A presença de EPS também é observada nos biofilmes mistos de *P. fluorescens* e *S. aureus* (Figura 4 E e F). As imagens do biofilme multiespécies evidenciam maior proporção de células de *P. fluorescens* no biofilme, caracterizada pela dominância de bactérias na forma de bastonetes, o que corrobora os resultados obtidos na quantificação de células aderidas. Os resultados

obtidos a partir das imagens de microscopia comprovam a adesão microbiana a superfície de aço inoxidável nos dois tipos de substratos analisados, e evidenciam biofilmes compactos e a presença de EPS, quando *P. fluorescens* está presente nas amostras. Desta forma, confirma-se o potencial de formação de biofilmes por esta bactéria nas condições experimentais usadas que simulam situações da indústria de laticínios, onde os substratos estão presentes e o armazenamento do leite cru sob refrigeração é obrigatório.

**Figura 4-** Fotomicrografia de imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura dos biofilmes no 10<sup>o</sup> dia de incubação a 7 °C. A) Biofilme individual de *P. fluorescens* em LDR 1% B) Biofilme individual de *P. fluorescens* em LDR 10% C) Biofilme individual de *S. aureus* em LDR 1% D) Biofilme individual de *S. aureus* em LDR 10% E) Biofilme multiespécies de *P. fluorescens* e *S. aureus* em LDR 1% F) Biofilme multiespécies de *P. fluorescens* e *S. aureus* em LDR 10%.



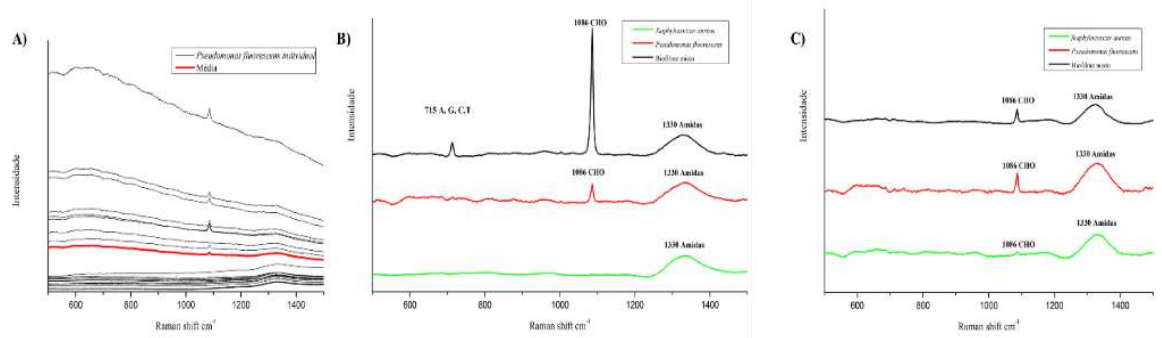
### 4.3 Composição química do biofilme obtida pela espectroscopia Raman

A Figura 5 (A) apresenta os espectros Raman antes do tratamento matemático e, a partir desses dados, é possível constatar a homogeneidade das amostras analisadas. O resultado reforça a necessidade dos tratamentos matemáticos para eliminar a interferência da fluorescência presente em cada espectro e evidenciar os picos Raman, para melhor observação da composição das amostras analisadas.

Após a remoção da linha de base dos espectros dos biofilmes individuais e multiespécies de *S. aureus* e *P. fluorescens*, os espectros Raman foram avaliados e estão apresentados na Figura 5 (B e C). Os espectros apresentados na Figura 5 (A e B) são relativos ao 10º dia de incubação e as comparações foram feitas em relação às modificações apresentadas em função do substrato de crescimento, das espécies em condições individuais ou associadas em co-cultura.

Diferenças na composição química dos biofilmes podem ser evidenciadas a partir da análise das intensidades dos espectros Raman nas amostras cultivadas em LDR 1% e LDR 10% (Figura 6 A e B). Os espectros dos biofilmes individuais e multiespécies nos dois substratos apresentaram picos semelhantes que, no geral, podem ser atribuídos a componentes celulares associados com DNA/RNA, proteínas, carboidratos, de acordo com a base de dados de Wickramasinghe *et al.* (2020). A composição da camada de EPS dos biofilmes pode variar ao longo do tempo e, segundo Liu *et al.* (2020), durante as diferentes etapas de formação dos biofilmes, a matriz EPS é bastante heterogênea e sua composição química está relacionada ao estágio específico da expressão de determinados genes. De acordo com Flemming *et al.* (2016), a formação da matriz do biofilme é um processo dinâmico e depende da disponibilidade de nutrientes, da síntese e da secreção de material extracelular, tensão de cisalhamento, competição social e influência de outros organismos.

**Figura 5-** A) Espectros Raman (sem tratamento matemático) de biofilmes individual de *P. fluorescens*. (B) Espectros Raman (com tratamento matemático) de biofilmes individuais de *S. aureus* (Linha verde); *P. fluorescens* (Linha vermelha); e biofilme multiespécies de *S. aureus* e *P. fluorescens* (Linha preta); em LDR 1% (B) e LDR 10% (C), após incubação a 7°C por 10 dias, em superfície de aço inoxidável.



No biofilme misto formado em LDR 1% destaca-se a presença de constituintes do DNA, caracterizada pelo pico formado na região próxima a  $715\text{ cm}^{-1}$  (Figura 5 B). Bases de DNA (A, G, C, T) formam picos na região entre  $600\text{ cm}^{-1}$  e  $1.200\text{ cm}^{-1}$  de acordo com Liu *et al.* (2020). Os constituintes do DNA encontrados nos biofilmes individuais e multiespécies, supostamente podem ser eDNA que participam da adesão das células em razão da carga negativa do polímero de DNA, que pode atuar como polímero eletrostático que ancora as células a uma superfície (LISTER; HORSWILL, 2014).

Nos biofilmes formados em LDR 1% picos de intensidade maior foram encontrados em torno de  $1.086\text{ cm}^{-1}$ , com maior intensidade no biofilme misto (Figura 5 B) e podem ser atribuídos à presença de carboidratos. Segundo Wickramasinghe *et al.* (2020), a região de  $1.050\text{ cm}^{-1}$  e  $1.200\text{ cm}^{-1}$  são características de carboidratos.

Os picos arredondados no espectro dos biofilmes encontrados em torno de  $1.330\text{ cm}^{-1}$  (Figura 6 A e B) podem ser atribuídos a proteínas (bandas Amida III e II encontradas em  $1.230\text{ cm}^{-1}$  e  $1.545\text{ cm}^{-1}$ ). Liu *et al.* (2020) consideraram as regiões de  $1.009\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.606\text{ cm}^{-1}$  e  $1675\text{ cm}^{-1}$  como relacionadas às proteínas.

Quando o cultivo foi feito em LDR 10%, os carboidratos não foram os principais constituintes do biofilme e o pico na região de  $1.050\text{ cm}^{-1}$  e  $1.200\text{ cm}^{-1}$  foi cerca de cinco vezes menor do que o observado no substrato diluído (Figura 6 A e B). A presença de proteínas foi aumentada nos biofilmes cultivados na presença de LDR 10% e ácidos nucleicos não foram detectados nesta condição (Figura 6 B). O cultivo em LDR 10% resultou em pico de carboidratos e proteínas mais intensos no biofilme individual de *P. fluorescens*, que pode ser explicado pela maior formação de biofilme quando comparado a *S. aureus*. Os resultados obtidos a partir da análise dos espectros Raman evidenciam a pouca ou nenhuma formação de biofilme por *S. aureus*, corroborando com os resultados da contagem de células e as análises microscópicas.

Informações limitadas estão disponíveis sobre a composição da matriz dos biofilmes formados por bactérias relacionadas a alimentos, mas em geral, os carboidratos são apontados como o principal constituinte. Os resultados obtidos no presente trabalho diverge dos resultados obtidos por Andre *et al.* (2019) que detectaram carboidratos em maior proporção do que proteínas e eDNA em biofilmes formados por uma mistura de três diferentes espécies de *S. aureus* em caldo Luria Bertani a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Wickramasinghe *et al.* (2020) analisaram a formação de biofilme de estirpes de duas diferentes espécies de *Pseudomonas* em carne a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e constataram que a concentração de carboidratos foi maior do que os outros componentes nas amostras de biofilme quando comparada com células planctônicas. Além disso, esses autores constataram que o teor de carboidratos foi maior em todos os biofilmes formados a temperatura de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  do que a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em biofilme formado por *P. fluorescens* a presença de polissacarídeo como alginato fornece estabilidade estrutural, importante, sobretudo em situações de alta tensão de cisalhamento (HENTZER *et al.*, 2001; MANN; WOZNIAK, 2012). Além dos carboidratos, as proteínas destacam-se como constituintes da EPS e segundo Lister e Horswill (2014), proteínas têm sido associadas como importantes elementos na fixação e com o desenvolvimento da matriz do biofilme.



## 5.0 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

*P. fluorescens*, contaminante frequente do leite cru foi capaz de aderir e formar biofilme em superfície de aço inoxidável e em temperatura de refrigeração em co-cultivo.

*S. aureus* não apresentou capacidade de formar biofilme nas mesmas condições. A quantidade de nutrientes disponíveis durante a formação do biofilme influencia na contagem de células microbianas sésseis.

A composição do EPS do biofilme varia com o substrato e uma caracterização mais completa de sua composição do biofilme em condições que simulem a realidade nos equipamentos da indústria de laticínios pode servir de subsídios para o estabelecimento de protocolos de sanitização mais adequados.

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIAT, C. *et al.* Microbiological and real-time mechanical analysis of bacillus licheniformis and *Pseudomonas fluorescens* dual-species biofilm. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 7, p. 747–756, 2019.

ALLEN, A.; HABIMANA, O.; CASEY, E. The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 165, p. 127–134, 2018.

ANDRE, C. *et al.* Changes in the composition and architecture of staphylococcal biofilm by nisin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1083–1090, 2019.

BEIER, B. D.; BERGER, A. J. Method for automated background subtraction from Raman spectra containing known contaminants. **The Analyst**, v. 134, n. 6, p. 1198, 2009.

BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 12, p. 2163–2176, 2008.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8533–8554, 2013.

CHAE, M. S. *et al.* Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 250–259, maio 2006.

CHERIF-ANTAR, A. *et al.* Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 1, p. 27–38, 2016.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318–326, 1982.

CRAMTON, S. E. *et al.* The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5427–5433, 1999.

DA SILVA MEIRA, Q. G. *et al.* Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 469–475, 2012.

DAI, J. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–10, 2019.

DUTRA, T. V. *et al.* Capacity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to produce biofilm on stainless steel surfaces in the presence of food residues. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 4, p. e13574, abr. 2018.

ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 990–1004, 2012.

FABRES-KLEIN, M. *et al.* An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 3, 2015.

FLEMMING, H. *et al.* Biofilms : an emergent form of bacterial life. **Nature Publishing Group**, 2016.

FLEMMING, H.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: The “House of biofilm cells”. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945–7947, 2007.

GIAOURIS, E. E.; SIMÕES, M. V. **Pathogenic Biofilm Formation in the Food Industry and Alternative Control Strategies**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 15

GOODACRE, R. *et al.* Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. **Microbiology**, v. 144, n. 5, p. 1157–1170, 1998.

GUALDI, L. *et al.* Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 2017–2024, 2008.

HENTZER, M. *et al.* Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. v. 183, n. 18, p. 5395–5401, 2001.

HUANG, W. E. *et al.* Shining Light on the Microbial World. In: **Advances in applied microbiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 70p. 153–186.

IVLEVA, N. P.; KUBRYK, P.; NIESSNER, R. Raman microspectroscopy, surface-enhanced Raman scattering microspectroscopy, and stable-isotope Raman microspectroscopy for biofilm characterization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 18, p. 4353–4375, 2017.

JINDAL, S. *et al.* Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9502–9513, 2016.

KASSINGER, S. J.; VAN HOEK, M. L. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2020.

KHAN, M. S. I.; LEE, E.; KIM, Y. A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37072, 2016.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 123–127, 2006.

KONO, H. *et al.* NMR spectroscopic structural characterization of a water-soluble  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 876–886, 2017.

KROLL, A. *et al.* Extracellular polymeric substances (EPS) of freshwater biofilms stabilize and modify CeO<sub>2</sub> and Ag nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110709, 2014.

KSONTINI, H.; KACHOURI, F.; HAMDY, M. Dairy Biofilm: Impact of microbial community on raw milk quality. **Journal of Food Quality**, v. 36, n. 4, p. 282–290,

2013.

LAUER CRUZ, K.; DE SOUZA DA MOTTA, A. Characterization of biofilm production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw buffalo milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 10, p. 4595–4604, 2019.

LEE, S. H. I. *et al.* Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1812–1816, 2014.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. v. 4, n. December, p. 1–9, 2014.

LIU, X. *et al.* Spatiotemporal organization of biofilm matrix revealed by confocal Raman mapping integrated with non-negative matrix factorization analysis. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 707–715, 2020.

LOURENÇO, A. *et al.* Evaluation of methods to assess the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1411–1417, 2012.

LU, X. *et al.* Application of mid-infrared and Raman spectroscopy to the study of bacteria. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 919–935, 22 ago. 2011.

MA, L. *et al.* Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, p. e1000354, 2009.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 627–634, 2013.

MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 893–916, 2012.

MARCHAND, S. *et al.* Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 133–147, 2012.

MARVASI, M.; VISSCHER, P. T.; CASILLAS MARTINEZ, L. Exopolymeric

substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 313, n. 1, p. 1–9, 2010.

MEESILP, N.; MESIL, N. Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 289–296, 2019.

MIRANI, Z. A. *et al.* Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 7, p. 760–769, 2018.

MOJICA, K.; ELSEY, D.; COONEY, M. J. Quantitative analysis of biofilm EPS uronic acid content. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 1, p. 61–65, 2007.

NEU, T. R. *et al.* Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, n. 1, p. 1–21, 2010.

O'TOOLE, G. A. To Build a Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2687–2689, 2003.

OLIVEIRA, G. S. *et al.* Multispecies biofilm formation by the contaminating microbiota in raw milk. **Biofouling**, v. 35, n. 8, p. 819–831, 2019.

ONICIUC, E. A.; CERCA, N.; NICOLAU, A. I. Compositional analysis of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 2014–2017, 2016.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PRINCY CHOUDHARY; SANGEETA SINGH; VISHNU AGARWAL. Microbial Biofilms. **Intech**, v. 32, p. 137–144, 1989.

PUGA, C. H.; ORGAZ, B.; SANJOSE, C. *Listeria monocytogenes* impact on mature

or old *Pseudomonas fluorescens* biofilms during growth at 4 and 20°C. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–9, 2016.

RAE, A. *et al.* State of the art Raman techniques for biological applications. **Methods**, v. 68, n. 2, p. 338–347, 2014.

READ, R. R.; COSTERTON, J. W. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 1080–1090, 1987.

REBROŠOVÁ, K. *et al.* Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

ROSSI, C. *et al.* Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 3, 2016.

SACHIDANANDHAM, R.; GIN, K. Y. H.; POH, C. L. Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 1, p. 24–31, 2005.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: Comparison of viability staining and direct culture. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 11, p. 1820–1823, 2010.

SILVA, C. L. G. DA *et al.* Evaluation of biofilm formation by bacterial strains isolated from milking equipment and milk samples from cows with mastitis Dissertação (Faculdade de Medicina Veterinária). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2017.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

THOMAS, V. C.; HANCOCK, L. E. Suicide and fratricide in bacterial biofilms. v. 32, n.

9, p. 537–544, 2009.

VALERO, A. *et al.* Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 186–194, 2009.

VERTES, A.; HITCHINS, V.; PHILLIPS, K. S. Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 3858–3866, 2012.

VIDHYALAKSHMI, R. *et al.* Production, characterization and emulsifying property of exopolysaccharide produced by marine isolate of *Pseudomonas fluorescens*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 320–325, 2018.

WEBER, M. *et al.* Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture dependent and -independent methods. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–21, 2019.

WICKRAMASINGHE, N. N. *et al.* Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020.

WILSON, C. *et al.* Microbial biofilms. **Review Microbiology**. Vol. 49: 711-745. 2018.

XU, Y. *et al.* Development of a Multiplex PCR Assay for Detection of *Pseudomonas fluorescens* with Biofilm Formation Ability. v. 0, n. 0, 2017.

YANG, L. *et al.* Current understanding of multi-species biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 74–81, 2011.

YUAN, L. *et al.* Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2019.



## 7.0 APÊNDICE

Espectros Raman (sem tratamento matemático) de biofilmes individuais de *P. fluorescens*; *S. aureus* e biofilme multiespécies de *P. fluorescens* e *S. aureus* em LDR 1% (A) e LDR 10% (B), a 7 °C por 10 dias em superfície de aço inoxidável.

