

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**“*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e
Bacillus cereus: QUORUM SENSING, FORMAÇÃO
DE BIOFILME E AÇÃO DE SANITIZANTES”**

Luciana Maria Ramires Esper
Farmacêutica-bioquímica-industrial

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

Dr. Marcelo Palma Sircili
Co-orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Es64e Esper, Luciana Maria Ramires
Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) e
*Bacillus cereus*_[LM1]: quorum sensing, formação de
biofilme e ação de sanitizantes / Luciana Maria
Ramires Esper. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Co-orientador: Marcelo Palma Sircili
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Biofilme. 2. *Enterobacter sakazakii*. 3.
Bacillus cereus. 4. Sanitizantes. 5. Quorum
sensing. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Sircili,
Marcelo Palma. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

Título em inglês: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *Bacillus cereus*_[LM4]: quorum sensing, biofilm formation and efficacy of sanitizers

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biofilm, *Enterobacter sakazakii*,
Bacillus cereus, Sanitization, Quorum sensing

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Maria Tereza Destro

Valéria Christina Amstalden Junqueira

Ernani Porto

Neura Bragagnolo

Data de defesa: 29/03/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador

Profa. Dra. Maria Tereza Destro

(Membro)

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira

(Membro)

Profa. Dra. Neura Bragagnolo

(Membro)

Prof. Dr. Ernani Porto

(Membro)

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

(Suplente)

Prof. Dr. José Luiz Pereira

(Suplente)

Profa. Dra. Lucia Durrant

(Suplente)

"Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por isso, aprendemos sempre".
Goethe

*À Deus pela vida, pelas bênçãos, amor e proteção,
Aos meus pais, exemplos de vida, caráter e amor,
Aos meus irmãos pelo apoio e companheirismo,
À minha avó Dalila, que tanto amo, pelo amor e ensinamentos
Vocês são meus exemplos de vida, fé, alegria, perseverança e força.
Muito Obrigada!!!
Dedico esse trabalho*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação, confiança, apoio e colaboração durante esse trabalho. Muito Obrigada pelo conhecimento transmitido nesses anos de mestrado e doutorado!!!

Ao prof. Dr. Marcelo Palma Sircili pela co-orientação e conhecimentos transmitidos. Obrigada!! A Franciely e Thiago do laboratório de Bacteriologia, muito obrigada!

A profa. Dra. Anita J. Marsaioli e Diana Araujo, pela imensa colaboração, acolhida no laboratório, conhecimentos e experiências transmitidas. Muito Obrigada!!!

À Dra. Dirce Kabuki, pela amizade, dia a dia do laboratório e colaboração nestes anos. Muito Obrigada!!!

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e correções na conclusão do trabalho. Muito obrigada!!! Agradeço a contribuição e ensinamentos.

À minha mãe, que sempre me mostrou o amor à pesquisa e é minha referência como pessoa e como profissional. Ao meu pai, que com sua integridade, caráter e amor sempre me apoiou e me deu todo suporte para realizar meus sonhos. À minha irmã, que sempre me ensina muito. Ao meu irmão. Muito obrigada à toda minha família. Eu os amo muito e serei eternamente grata.

Ao Mauricio Weber, por todo o apoio, companherismo, carinho, sempre me incentivando, e acreditando que iria conseguir realizar esse trabalho, mesmo nas horas mais difíceis. Muito obrigada!!!

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (secretaria, professores e laboratórios).

Ao Laboratório de Higiene e Legislação: Dirce, D. Denir, Vanessa, Maristela, Raquelzita, Bia, Barbara, Marcília, Maria Amélia, Graci, Meg, Marisa, Isa, Andrea e Celina.

Aos laboratorios de Química, de Bacteriologia e Microscopia Eletrônica: muito obrigada pela acolhida nos inúmeros dias de experimentos. Foram dias de muito trabalho, mas de muita alegria por conhecer pessoas tão especiais.

Aos amigos, pessoas especiais, aos quais agradeço muito: Karen S. Pereira, Rosana Siqueira, Anderson S'Antana, Raquel e Isa. Muito Obrigada pela amizade e muitos momentos especiais!!!

Ao CNPQ pela bolsa de estudo a mim concedida.

À todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho .

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
RESUMO GERAL.....	xix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I - REVISAO BIBLIOGRÁFICA´.....	5
1. Fórmula infantil e microrganismos de importância.....	5
2. Adesão microbiana e formação de biofilmes.....	10
2.1. Definição.....	10
2.2. Fenômenos associados à formação de biofilmes.....	11
2.3. Características e fatores que influenciam a adesão microbiana e formação de biofilmes.....	14
2.4. Biofilmes na indústria de alimentos.....	16
3. Sistema <i>Quorum sensing</i>	18
4. Sistema <i>Quorum quenching</i>	22
5. Referencias bibliográficas.....	24
CAPÍTULO II - Formação de biofilmes mono e multi-espécies de <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) e <i>Bacillus cereus</i> em superfície de aço inoxidável e sua inativação por sanitizantes químicos.....	33
Resumo.....	33
Summary.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. Material e Métodos.....	37
2.1. Amostras bacterianas e condições de cultivo.....	37
2.2. Preparo dos cupons de aço inoxidável.....	37
2.3. Formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável utilizando fórmula infantil e meio de cultura LB.....	38
2.4. Determinação do número de células sésseis.....	39
2.5. Avaliação da formação dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura.....	39
2.6. Avaliação da eficiência de sanitizantes na remoção dos biofilmes.....	40
2.6.1. Preparo das soluções de sanitizantes.....	40
2.6.2. Aplicação da solução de sanitizantes.....	40
2.7. Análises estatísticas.....	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

3.1. Formação de biofilme em superfície de aço inoxidável utilizando meios de cultura Luria Bertani e fórmula infantil	41
3.1.1. Formação de biofilmes mono-espécie.....	43
3.1.2. Formação de biofilmes multi-espécies	45
3.2. Avaliação da formação dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura	48
3.3. Avaliação da eficiência de sanitizantes na remoção dos biofilmes	51
4. Conclusão.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO 1	57
APÊNDICE.....	59
CAPÍTULO III - <i>Quorum sensing</i> e <i>Quorum quenching</i> em <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) e <i>Bacillus cereus</i>	63
Resumo	63
Summary.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	65
2. MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1. Cepas bacterianas.....	67
2.2. Pesquisa do auto indutor AI-1, acil homoserinas lactonas (acil-HSL) em <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) e <i>B. cereus</i>	68
2.2.1. Bioensaio com <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) e <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 utilizando cultivos de <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.), <i>B. cereus</i> e cultivo misto	68
2.2.2. Bioensaio com extratos de cultivos de <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.), <i>B. cereus</i> e cultivo misto com <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) e <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026.....	69
2.2.3. Detecção de acil-homoserina lactonas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	70
2.2.4. Confirmação das estruturas das acil-homoserinas lactonas	71
2.2.5. Degradação de acil homoserinas sintéticas por <i>Bacillus cereus</i>	71
2.3. Avaliação da possível presença dos autoindutores AI-2 e AI-3.....	72
2.3.1. Detecção do gene <i>luxS</i>	72
2.3.2. Avaliação da atividade de β -galactosidase (SIRCILI, 2004).....	73
2.3.3. Efeito de acil-homoserinas lactonas sobre <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) e <i>B. cereus</i> submetidos ao teste de sensibilidade à antimicrobianos	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1. Pesquisa do auto-indutor AI-1, acil homoserinas lactonas (acil-HSL) em <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) e <i>B. cereus</i>	76

3.1.1. Bioensaios com cultivos de <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.), <i>B. cereus</i> e cultivo misto e os biossensores <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4) e <i>C. violaceum</i> CV026.....	76
3.1.2. Bioensaios com extratos de cultivos de <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.), <i>B. cereus</i> e cultivo misto e os biossensores <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) e <i>C. violaceum</i> CV026	77
3.1.3. Detecção e caracterização de acil-homoserina lactonas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	78
3.1.4. Degradação de acil homoserinas sintéticas por <i>Bacillus cereus</i>	83
3.2. Avaliação da possível presença dos auto-indutores AI-2 e AI-3 em <i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) e <i>Bacillus cereus</i>	84
3.2.1 Ocorrência do gene <i>luxS</i> , indicativo da presença do auto-indutor AI-2	84
3.2.2. Pesquisa de auto- indutor AI-3 pela atividade de β -galactosidase ...	85
3.2.3. Efeito de autoindutores (acil-HSL) sobre <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) e <i>Bacillus cereus</i> submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos	87
4. CONCLUSÕES.....	91
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE.....	99
CONCLUSÕES GERAIS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Etapas de formação do biofilme (a) por microscopia eletrônica e (b) esquemática..... 12
- Figura 2.** Processos envolvidos na formação e crescimento de biofilmes 13

Capítulo II – Formação de biofilmes mono e multi-espécies de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável e sua inativação por sanitizantes químicos

- Figura 1.** Evolução da população (log UFC/cm²) de células sésseis de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4, em cultivos isolados e misto em caldo Luria Bertani. Cada ponto corresponde à média de três repetições em triplicata 42
- Figura 2.** Evolução da população (log UFC/cm²) de células sésseis de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4, em cultivos isolados e misto em fórmula infantil reconstituída. Cada ponto corresponde à média de três repetições em triplicata 42
- Figura 3.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, não submetidos ao processo de adesão e formação de biofilmes nos aumentos de 1500X (a) e 4000X (b) 49
- Figura 4.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de adesão e formação de biofilmes por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em caldo Luria Bertani a 25 °C por 24 horas (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e (d) 49
- Figura 5.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de adesão e formação de biofilme por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em fórmula infantil a 25 °C por: 24 horas (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e (d). 50
- Figura 6.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de adesão por *Bacillus cereus* em caldo Luria Bertani a 25 °C por 24 horas (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e (d) 50

Capítulo III – Quorum sensing e Quorum quenching em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*

- Figura 1.** Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.); B. *B. cereus*; C. Controle negativo. Ensaios realizados em duplicata 78
- Figura 2.** Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. (S)-dodecanoil-HSL (controle positivo); B. Controle negativo; C. Extrato acetato de etila de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), indicando presença de acil-HSL. Ensaios realizados em duplicata 78
- Figura 3.** Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) nas frações do extrato de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). A. Controle positivo(S)-dodecanoil-HSL; B. Controle negativo; C, D, E, F e G. frações positivas ao bioensaio (F60 a 64); F, G e H. frações negativas ao bioensaio (F65 a 68)..... 79
- Figura 4.** Atividade biológica com o biossensor *Chromobacterium violaceum* CV026 nas frações do extrato de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). A. Controle negativo.; B. Controle positivo (S)-heptanoil-HSL ; C, D e E. frações negativas ao bioensaio (F53,54 e 55); F, G e H. frações positivas ao bioensaio (F56, 57 e 58) 79
- Figura 5.** A. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração F59 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). B. Espectro de massas de N-heptanoil-HSL (1) 80
- Figura 6.** A. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração F63 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). B. Espectro de massas de N-dodecanoil-HSL (2)..... 80
- Figura 7.** A. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração F55 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) B. Espectro de massas de N-tetradecanoil-HSL (3) 81
- Figura 8.** Atividade biológica do extrato de cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. (S)-dodecanoil-HSL (controle positivo); B. Controle negativo; C. Fração F42. Os demais tubos são algumas das frações do extrato do cultivo misto, apresentando resultado negativo ao bioensaio. Ensaios realizados em duplicata 82
- Figura 9.** Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração M42 do extrato acetato de etila do cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus*, evidenciando o pico da N-dodecanoil-HSL 82
- Figura 10.** Atividade biológica com o biossensor *C. violaceum* CV026. A. Controle positivo N-heptanoil-HSL com o biossensor; B. *B. cereus* com (S)-N-heptanoil-HSL, indicando a não detecção da acil-HSL pelo biossensor 83

- Figura 11.** Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4):
A. *B. cereus* com (S)-dodecanoil-HSL, indicando a não detecção da acil-HSL pelo biossensor; B. Controle positivo (S)-dodecanoil-HSL com o biossensor.... 84
- Figura 12.** Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *luxS* em *E. Sakazakii* (*Cronobacter* spp.). 1. Controle negativo; 2. Marcador de peso molecular 1Kb. 3. Controle positivo. 4. Cepa *E.sakazakii* (*Cronobacter* spp.)..... 85
- Figura 13.** Atividade de β -galactosidase da amostra TEVS232 crescida em meios pré condicionados com amostras de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*..... 86
- Figura A1.** Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. Fração F59 do extrato acetato de etila do cultivo de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). B. Produto sintético (\pm)-N-heptanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F59 com o produto sintético..... 99
- Figura A2.** Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. Fração F63 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) . B. Produto sintético (\pm)-N-dodecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F63 com o produto sintético..... 100
- Figura A3.** Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. Fração F55 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). B. Produto sintético (\pm)-N-tetradecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F55 com o produto sintético..... 101

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Bactérias de origem alimentar que possuem homólogos ao gene *luxI* e *luxR* de *Vibrio fischeri*21

Capítulo II – Formação de biofilmes mono e multi-espécies de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável e sua inativação por sanitizantes químicos

Tabela 1. Formação de biofilme mono-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em caldo Luria Bertani sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 44

Tabela 2. Formação de biofilme mono-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em fórmula infantil sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 44

Tabela 3. Formação de biofilme multi-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em caldo Luria Bertani sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 47

Tabela 4. Formação de biofilme multi-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em fórmula infantil sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 47

Tabela A1. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados sobre cupons de aço inoxidável AI304 #4 em caldo Luria Bertani 59

Tabela A2. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados sobre cupons de aço inoxidável AI304 #4 em caldo Luria Bertani..... 59

Tabela A3. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados sobre cupons de aço inoxidável AI304 #4 em fórmula infantil..... 59

Tabela A4. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados sobre cupons de aço inoxidável AI304 #4 em fórmula infantil 60

Tabela A5. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados em cultivo misto com *Bacillus cereus*, sobre cupons de aço inoxidável AI304 #4 em caldo Luria Bertani..... 60

Tabela A6. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados em cultivo misto com *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), sobre cupons de aço inoxidável AI304 #4 em caldo Luria Bertani..... 60

Tabela A7. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados em cultivo misto com *Bacillus cereus*, sobre cupons de aço inoxidável A1304 #4 em fórmula infantil61

Tabela A8. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados em cultivo misto com *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), sobre cupons de aço inoxidável A1304 #4 em fórmula infantil61

Capítulo III – *Quorum sensing* e *Quorum quenching* em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*

Tabela 1. Influência da adição de diferentes concentrações de acil homoserinas lactonas na sensibilidade de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) a antimicrobianos.....89

Tabela 2. Influência da adição de diferentes concentrações de acil homoserinas lactonas na sensibilidade de *Bacillus cereus* a antimicrobianos.....90

RESUMO GERAL

A contaminação de fórmulas infantis por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* pode ter como origem o contato do alimento com biofilmes formados em ambientes, utensílios e equipamentos empregados na sua produção ou posterior reconstituição nos locais de distribuição. A grande preocupação em relação a estas bactérias é a presença das mesmas em fórmulas infantis, produtos estes utilizados como fonte de alimentação para lactentes de forma exclusiva ou em combinação com outros alimentos. A formação de biofilmes, assim como outros mecanismos celulares como por exemplo a produção de bacteriocinas e fatores de virulência, podem ser modulados pelo processo de comunicação célula-célula ou *quorum sensing* - mecanismo de sinalização célula-célula mediada pelo acúmulo de uma classe ou mais de moléculas sinalizadoras produzidas pela célula e excretadas para o meio externo. Por sua vez, a quebra deste sistema, pela degradação das moléculas sinalizadoras de comunicação, denomina-se *quorum quenching*. Neste trabalho objetivou-se, primeiramente, a avaliação da dinâmica de formação de biofilmes mono e multi-espécies de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* em superfície de aço inoxidável utilizando-se como meios de cultivos fórmula Infantil (FI) e caldo Luria Bertani (LB) e a eficácia de soluções de ácido peracético e de hipoclorito de sódio na inativação desses biofilmes. Outro objetivo principal foi pesquisar a ocorrência dos sistemas *quorum sensing* e *quorum quenching* em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* e a possível influência das moléculas sinalizadoras na sensibilidade destas bactérias aos antimicrobianos. A formação de biofilmes ocorreu de forma mais intensa ao utilizar-se a fórmula infantil, quando comparado com o meio de cultivo LB, fato este relevante por ser a fórmula infantil o mais conhecido e importante veículo de transmissão de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). Tanto em cultivo mono-espécie quanto em cultivo misto, o nível de contagem de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) superou o de *B. cereus* e para ambos o maior desenvolvimento ocorreu em cultivos mono-espécie. Em todos os biofilmes de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* isoladamente e em cultura mista, produzidos em caldo LB e independente do tempo de formação,

as contagens foram reduzidas a níveis inferiores a 1 logUFC/cm² quando em contato com soluções de ácido peracético ([500mg/L]) e hipoclorito de sódio ([100mg/L]) por 15 minutos. No entanto, para os biofilmes produzidos em fórmula infantil ocorreram algumas situações, em que as contagens de microrganismos após o contato com as soluções de sanitizantes, foram superiores a 1 logUFC/cm², evidenciando assim a ineficácia do procedimento de sanitização para alguns biofilmes formados a 5 dias ou mais e a necessidade da higienização das superfícies ser realizada o mais próximo do término do processamento ou reconstituição destes alimentos. Evidenciou-se a existência dos sistemas *quorum sensing* e *quorum quenching*, através dos testes de atividades biológicas das culturas, extratos e suas frações. Os testes com os biossensores revelaram-se positivos para a produção de homoserinas lactonas em cepa de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e negativos para a espécie *B. cereus*. Em cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* observou-se a redução e/ou a não detecção das homoserinas lactonas fato este possivelmente associado ao fenômeno *quorum quenching*. A possível presença de moléculas sinalizadoras AI-2 e AI-3 foi evidenciada, sendo confirmada a presença de moléculas sinalizadoras AI-1. A caracterização do AI-1 realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) revelou a capacidade da cepa de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em produzir três compostos, *N*-heptanoil-HSL, *N*-dodecanoil-HSL e *N*-tetradecanoil-HSL, substâncias estas ainda não reportadas na literatura para o microrganismo em estudo. Os autoindutores sintéticos C7-HSL, C12-HSL e C14-HSL adicionados a cultura de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* não exerceram efeito sobre a sensibilidade aos antimicrobianos, sugerindo que estas moléculas não estariam envolvidas em mecanismos de resistência a estes antimicrobianos. Em resumo este trabalho representa um importante passo no estudo da formação de biofilmes e dos sistemas *quorum sensing* e *quenching* para as bactérias em questão, cujos conhecimentos são de grande interesse na segurança dos alimentos.

SUMMARY

The contamination of infant formulas by *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *Bacillus cereus* can occur due to contact with biofilms formed in the environment and on equipment used in their production and reconstitution. There is concern about these bacteria due to their presence in foods used as a source of nutrition for infants. Biofilm formation as a wide spectrum of important processes is reported to be regulated by quorum sensing, including, for example, antibiotic production and virulence. Cell-to-cell communication or bacterial quorum sensing is a signaling mechanism that refers to the ability of bacteria to respond to chemical molecules called autoinducers, in response to cell density. Degradation of the signaling molecule prevents it from accumulating in sufficient amounts, leading to disruption of the communication system, known as quorum quenching. The aim of this study was first to evaluate the formation of mono and multi-species biofilms of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *B. cereus* on stainless steel surfaces using infant formula (FI) and Luria Bertani (LB) broth as the culture media, and the efficacy of sodium hypochlorite and peracetic acid in inactivating these biofilms. The other objective was to investigate the involvement of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *Bacillus cereus* in quorum sensing and quorum quenching systems and the possible influence of the signaling molecules on the sensibility of these bacteria to antimicrobials. The formation of biofilms was greater when using the infant formula than the Luria Bertani broth, this fact being important since the infant formula is considered to be an important vehicle in the transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to infants. In both cases, the growth of the mono species was greater than in the multi species culture. In all the biofilms formed in the Luria Bertani broth, independent of the time of formation, the counts were reduced to less than 1 log CFU/cm² when in contact with sodium hypochlorite ([100mg/L]) or peracetic acid ([500mg/L]). However for the biofilms produced in the infant formula, many situations occurred, with counts more than 1 log CFU/cm² in some situations after the contact with sanitizers highlighting the need for an

efficient sanitization of the surfaces as soon as the processing or reconstitution of these foods has finished. The experiments with biosensors provided evidence of the occurrence of quorum sensing and quorum quenching systems using bioassays with the cultures and extracts of the microorganisms under examination. These bioassays were positive for the production of homoserine lactone by *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) but negative for *B.cereus*. In the mixed culture a reduction and/or non-detection of the homoserine lactone was observed, a fact that could be associated with quorum quenching. A possible presence of the signaling molecules AI-2 and AI-3 was evident and the presence of AI-1 was confirmed. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses allowed for a chemical identification of the production of *N*-heptanoyl-HSL, *N*-dodecanoyl-HSL and *N*-tetradecanoyl-HSL by the *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), a fact not previously reported in the literature. The addition of synthetic signaling molecules (*N*-heptanoyl-HSL, *N*-dodecanoyl-HSL and *N*-tetradecanoyl-HSL) had no significant effect on the sensibility of the *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *B. cereus* strains to antimicrobials. In summary this study represents an important step in biofilm's formation, quorum sensing and quorum quenching in these bacteria that are of great interest in food safety.

INTRODUÇÃO GERAL

Enterobacter sakazakii é uma bactéria patogênica emergente, Gram negativa não formadora de esporos, formadora de cápsula de material polissacarídeo, que tem sido associada a diversos surtos e casos de meningites principalmente em neonatos (IVERSEN; FORSYTHE, 2003; GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005).

Recentemente, a taxonomia de *Enterobacter sakazakii* foi alterada com a criação do gênero *Cronobacter*, que agrupa seis espécies (IVERSEN et al., 2008). O Codex Alimentarius adotou a nomenclatura *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) nos textos da então denominada *Enterobacter sakazakii* (FAO/WHO, 2008). No presente trabalho, esta denominação também foi adotada.

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) têm sido isolada de inúmeras fontes alimentares, ambientais e clínica, porém fórmula infantil tem sido o principal veículo de transmissão (MULLANE et al., 2008; IVERSEN ;FORSYTHE, 2003; GURTLER;KORNACKI;BEUCHAT, 2005).

Bacillus cereus, bactéria Gram positiva, produtora de esporos termorresistentes, amplamente disseminada no meio ambiente e de difícil eliminação durante o processamento (ANDERSSON et al.,1995), também apresenta grande importância. Produtos lácteos desidratados e alimentos infantis, como por exemplo, as fórmulas infantis são reconhecidamente fontes frequentes de contaminação por *Bacillus cereus* (BECKER et al., 1994).

Estas bactérias quando presentes na fórmula infantil podem aderir e formar biofilmes nos ambientes e em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados tanto na produção quanto na reconstituição do produto. Infecções neonatais foram associadas à colonização por *E. sakazakii* em liquidificador utilizado na preparação da fórmula infantil reconstituída (BAR-OZ et al., 2001).

Um fato muito preocupante é que o desenvolvimento de células em biofilme promove a expressão de propriedades distintas das células suspensas, uma das quais é o aumento da resistência aos sanitizantes (HOOD; ZOTTOLA, 1995; KIM; RYU; BEUCHAT, 2007).

Biofilmes formados por microrganismos patogênicos têm sido considerados de grande importância no contexto de segurança alimentar despertando o interesse de inúmeros grupos de pesquisas (ZOTOLLA; SASAHARA, 1994; GANDARA; OLIVEIRA, 2000; SHARMA; ANAND, 2002; SHI; ZHU, 2009).

A formação de biofilmes, assim como, as outras funções celulares como esporulação, fatores de virulência e produção de bacteriocinas, pode ser modulada pelo processo de comunicação célula-célula ou *quorum sensing*, um mecanismo de sinalização célula-célula. A regulação deste sistema é mediada pelo acúmulo de uma ou mais moléculas sinalizadoras produzidas pela célula e excretada para o meio externo. Estes compostos, denominados autoindutores ou moléculas sinalizadoras, quando atingem uma concentração crítica, são detectadas pelas bactérias que respondem a este sinal, alterando a expressão de determinados genes (WATERS; BASSLER, 2005; READING; SPERANDIO, 2006).

Alguns sistemas de *quorum sensing* utilizados por bactérias já foram descritos: (1) sistema tipo LuxR/I, sendo este utilizado por bactérias Gram-negativas, na qual as moléculas sinalizadoras são as acil homoserinas lactonas (AI-1); (2) a sinalização por peptídeos, utilizados por bactérias Gram-positivas; (3) a sinalização tipo *LuxS/AI2*, utilizados tanto por bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, para comunicação inter-espécie; e (4) sistema de comunicação AI3/epinefrina/não-epinefrina (READING; SPERANDIO, 2006).

A ocorrência do sistema *quorum sensing* em bactérias deterioradoras e patogênicas nos alimentos já tem sido demonstrada. (SMITH; FRATAMICO; NOVAC, 2004; CHRISTENSEN et al., 2003; FLOGGAARD et al., 2003 ; GRAM, et al., 2002; GRAM et al., 1999).

A quebra deste sistema de comunicação, denominado sistema *quorum quenching*, tem grande importância na área médica, alimentar e ambiental, considerando os inúmeros processos regulados pelo sistema *quorum sensing* (ULRICH, 2004; MARTINEZ et al., 2007).

OBJETIVOS

Os principais objetivos nesse trabalho foram:

- Avaliar a formação de biofilmes mono e multi-espécies de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* em superfície de aço inoxidável utilizando-se como meios de cultivo, fórmula Infantil (FI) e caldo Luria Bertani (LB) e a eficácia de soluções de ácido peracético e de hipoclorito de sódio na inativação desses biofilmes.
- Pesquisar a ocorrência dos sistemas *quorum sensing* e *quorum quenching*, sistemas tão importantes e pouco estudados na área de alimentos, em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus*, e a possível influência das moléculas sinalizadoras na sensibilidade destas bactérias aos antimicrobianos.

CAPÍTULO I - REVISAO BIBLIOGRÁFICA

1. Fórmula infantil e microrganismos de importância

Fórmulas infantis são utilizadas quando há a impossibilidade de amamentação de lactentes pelas mães ou estas optam por não amamentá-los com leite materno (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997).

A Portaria nº 977/1998 (BRASIL, 1998), publicada pela Secretaria de Vigilância Sanitária estabelece o regulamento técnico para as fórmulas infantis e segundo o mesmo, considera-se fórmula infantil para lactentes o produto em forma líquida ou em pó, destinado à alimentação de lactentes, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite humano, para satisfação das necessidades nutricionais deste grupo etário. Lactente é a criança de zero a doze meses de idade incompletos. Quanto à forma de apresentação pode ser encontrada como: líquida pronta para o consumo, não necessitando de diluição; líquida concentrada, necessitando de diluição em água e em pó, necessitando de água para seu preparo.

As fórmulas infantis em pó são as mais utilizadas como fonte de alimentação para lactentes de forma exclusiva ou em combinação com outros alimentos. Para simular o leite materno, o leite de vaca é modificado pela redução de seu conteúdo de proteína total e mineral, mas aumento do teor de proteína do soro, do teor de carboidrato e da porcentagem de Ca/P. O teor de gordura também é modificado e vitaminas são adicionadas (IVERSEN; FORSYTHE, 2003).

Na produção industrial das fórmulas infantis são utilizados geralmente processos a seco ou úmido, de forma distinta ou combinada (ZINK, 2003), estes processos podem apresentar diferentes riscos e benefícios quando se refere ao potencial de contaminação do produto por bactérias.

No processo a seco os ingredientes são preparados individualmente, tratados termicamente, desidratados e então misturados a seco. A não utilização

de água em seu processamento reduz a possibilidade de bactérias se estabelecerem no ambiente de produção em números elevados. A qualidade do produto produzido é primordialmente determinada pela qualidade microbiológica dos constituintes secos anterior à mistura (ZINK, 2003).

Já no processo úmido (*spray drying*), todos os ingredientes são misturados, homogeneizados, pasteurizados e desidratados produzindo um produto em pó.

O fato preocupante é que este produto não é estéril e pela sua composição torna-se um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (VARGAS-LEGUA´S et al., 2009). As condições inadequadas de produção, armazenamento e manipulação das fórmulas em pó representam risco à saúde dos lactentes. Alguns microrganismos já foram detectados em fórmulas infantis e estas já foram incriminadas como em casos e surtos de doenças de origem alimentar, assim como óbitos de lactentes (FAO/WHO, 2008).

O *Codex alimentarius* (FAO/WHO, 2008), identifica três categorias de microrganismos baseado na força da evidência de uma associação causal entre a presença do microrganismo na formula infantil e a doença em bebês:

- A. Microrganismos com a clara evidência da causalidade, nominalmente *Salmonella enterica* e *Enterobacter sakazakii*.
- B. Microrganismos na qual a causalidade é possível, mas ainda não demonstrado, por exemplo, eles são conhecidamente causadores de doenças em bebês e tem sido encontrados em fórmula infantil, mas a fórmula infantil ainda não foi demonstrada epidemiologicamente ou microbiologicamente como sendo veículo e fonte de contaminação. Exemplo desta classe: outras enterobactérias.
- C. Microrganismos cuja causalidade é menos possível ou ainda não demonstrado, incluindo aqueles que apesar de causar doenças em bebês ainda não foram identificados em fórmulas infantis ou aqueles que têm sido identificados em fórmulas infantis, mas não implicados como causador de doenças em bebês incluindo *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*,

Clostridium difficile, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Enterobacter sakazakii é uma bactéria patogênica emergente, Gram negativa, formadora de cápsulas de material polissacarídeo, mas não de esporos, que tem sido associada a diversos casos e surtos de meningites principalmente em neonatos, podendo causar também enterocolite necrozante, bacteremia e septicemia. Por esta razão, em alguns países tem-se aumentado a preocupação das autoridades de saúde pública em relação a este microrganismo (BIERING et al, 1989; VAN ACKER et al. 2001; IVERSEN; FORSYTHE, 2003; GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005).

Recentemente, a taxonomia de *Enterobacter sakazakii* foi alterada com a criação do gênero *Cronobacter*, que agrupa as espécies *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter dublinensis* e *Cronobacter genomospecies*, assim como as subespécies *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis*, *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* e *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* (IVERSEN et al. 2008). O *Codex Alimentarius* adotou a dupla nomenclatura “*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.)” em seus textos (FAO/WHO, 2008). No presente trabalho, esta denominação também foi adotada.

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) têm sido isoladas de inúmeras fontes alimentares, ambientais e clínicas, porém fórmula infantil tem sido o principal veículo de transmissão deste microrganismo (MULLANE et al., 2008; IVERSEN; FORSYTHE, 2003; GURTLER, KORNACKI, BEUCHAT, 2005).

No Brasil, Santos (2006) avaliou 86 amostras de fórmulas infantis em pó, 20 de fórmulas reconstituídas e 5 amostras de amido. Destas, em 12 (14%) amostras de fórmulas em pó e em 4 (8%) amostras de amido foram detectados *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.).

Palcich et al. (2009), avaliaram a população de *Enterobacter sakazakii* e enterobactérias em amostras de fórmula infantil em pó e reconstituída, ambientes das cozinhas, água, mamadeiras, utensílios e mãos dos manipuladores. *E.*

sakazakii foi detectada em fórmula infantil em pó e em resíduos de uma mamadeira em um hospital. O patógeno também foi encontrado em uma esponja do hospital avaliado.

Kim, Ryu e Beuchat (2006) demonstraram a formação de biofilmes de *E. sakazakii* em aço inoxidável e tubos de alimentação enteral quando estes eram imersos em fórmula infantil.

Iversen, Lane e Forsythe (2004), demonstraram a capacidade de *E. sakazakii* se multiplicar, quando cultivada em fórmula infantil, em temperatura de refrigeração e formar biofilmes a 37°C em superfícies como látex, silicone e em menor quantidade no aço inoxidável.

A capacidade de *E. sakazakii* em formar biofilme, combinada à alta resistência ao estresse osmótico pode favorecer a sua persistência no ambiente após a colonização nos equipamentos utilizados no preparo dos alimentos (LEHNER; STEPHAN, 2004).

Outro microrganismo que consideramos importante à pesquisa e que devido às suas características pode sobreviver e permanecer nas fórmulas infantis desidratadas é a bactéria *Bacillus cereus*.

Produtos lácteos desidratados e alimentos infantis, como por exemplo, as fórmulas infantis são reconhecidamente fontes frequentes de contaminação por *Bacillus cereus* (BECKER et al., 1994).

Reyes et al. (2007) pesquisaram a prevalência de *B. cereus* em 381 amostras de produtos lácteos em pó distribuídos em escolas chilenas, como parte de um programa de alimentação, e observaram que 175 estavam contaminadas com o microrganismo, constituindo-se então um risco potencial para a segurança dos produtos reconstituídos.

Bacillus cereus é uma bactéria Gram positiva, amplamente distribuída na natureza, móvel e pode causar dois tipos de doenças de origem alimentar, a síndrome emética e diarréica. Esta bactéria sobrevive a várias condições ambientais por sua habilidade em formar endosporos resistentes ao calor, à

desidratação e a outros agentes físicos. Produz uma série de fatores de virulência e pode causar dois tipos de doenças de origem alimentar: a síndrome diarréica e a síndrome emética (BENNETT; BELAY, 2001; SCHOENI; WONG, 2005).

Conforme os riscos associados às fórmulas infantis e a fim de reduzir o risco de infecções aos lactentes, a Food and Drug Administration – FDA dos Estados Unidos (UNITED STATES, 2007) faz algumas recomendações para a manipulação das fórmulas infantis:

- Utilizar água fervida na reconstituição das fórmulas.
- Esterilizar e lavar sempre após o uso, os materiais que entram em contato com as fórmulas (mamadeiras, liquidificador e utensílios).
- Sempre observar alterações na cor, odor e sabor da fórmula infantil e conferir o prazo de validade.
- Reconstituir apenas uma pequena quantidade de fórmula para cada alimentação diminuindo, portanto, a quantidade e o tempo que a fórmula é mantida a temperatura ambiente antes do consumo.
- Reconhecer as diferenças entre reconstituir a fórmula infantil em hospitais e locais individuais (como residências). Devem-se tomar medidas apropriadas para cada situação para minimizar a multiplicação microbiana em fórmulas infantis.
- Minimizar o tempo de armazenamento tanto em temperatura ambiente quanto em refrigeração, antes da alimentação.

Com estas medidas de controle por parte dos manipuladores e controle na cadeia de produção, espera-se reduzir o risco para os bebês e crianças associados ao consumo das fórmulas infantis.

2. Adesão microbiana e formação de biofilmes

2.1. Definição

As superfícies ou utensílios que entram em contato com os alimentos, não deveriam contaminar os produtos durante o processamento e industrialização, porém sabe-se que em determinadas situações microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes depositam-se, aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular. Ao se multiplicarem, formam micro-colônias e quando a massa celular é suficiente para que a ela sejam agregados nutrientes, resíduos e outros microrganismos forma-se o que é denominado biofilme microbiano (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

A primeira publicação sobre bactérias aderidas a superfícies foi de Zobell (1943) na qual se descreve a adesão de bactérias marinhas em superfícies submersas. No trabalho o autor observou que a adesão era dependente do tempo, quanto maior o tempo, maior a massa de células (apud HOOD; ZOTOLLA, 1998).

A definição exata do que seja biofilme ainda não é consensual nos meios acadêmicos e existem várias definições descritas na literatura, da qual destacamos alguns exemplos:

- i) Os biofilmes microbianos são definidos como uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos aderidos entre si e/ou à uma superfície ou interface (COSTERTON et al., 1995).
- ii) Biofilme é um conjunto de microrganismos que estão irreversivelmente associados (não removível por enxágüe leve) a uma superfície, dentro de uma matriz de material polissacarídeo (DONLAN, 2002).

Segundo Dunnes (2002), apesar de todas as definições há três elementos básicos em um biofilme: microrganismos, glicocálix (exopolissacarídeos-EPS) e superfície. Se um destes componentes for removido, o biofilme não se desenvolve.

No entanto, Schneider (2007) propôs uma nova definição para os biofilmes abrangendo os microrganismos que não produzem a matriz de exopolímeros (EPS). Segundo o autor “biofilmes são comunidades de microrganismos, aderidas à superfícies ou suspensas em solução, cujas células podem ou não estar envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes”.

Andrade, Bridgeman e Zotolla (1998) propõem como forma de diferenciar ou delimitar o fenômeno de “adesão” da “formação de biofilme”, a quantidade de células presentes por cm^2 , segundo os autores, para se considerar um biofilme é necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 . Porém, na literatura encontramos inúmeros trabalhos que consideram como biofilmes todas as contagens obtidas após a etapa de remoção das células planctônicas (RONNER; WONG, 1993; IVERSEN; LANE; FORSYTHE, 2004; GUNDUZ; TUNCEL, 2006; KIM; RYU; BEUCHAT, 2006; KIM; RYU; BEUCHAT, 2007).

Apesar das diferentes definições, há um consenso, em todos os casos observam-se fenótipos semelhantes aos biofilmes, como por exemplo, os estágios de desenvolvimento, a resistência à antibióticos e aos biocidas (O'TOOLE; GHANNOUM, 2004).

2.2. Fenômenos associados à formação de biofilmes

Primeiramente é importante esclarecer algumas definições: quando as células estão livres são designadas planctônicas e quando estão associadas a uma superfície em processo de adesão e formação de biofilmes são denominadas sésseis (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998).

A formação de biofilmes é resultado de vários fenômenos de natureza física e biológica, constituindo-se em várias etapas. Na literatura há diversas teorias que tentam explicar a formação do biofilme.

Marshall et al., (1971) (apud ZOTOLLA; SASAHARA, 1994) descrevem o processo em duas etapas, sendo a primeira reversível e a segunda irreversível.

Na etapa reversível, os microrganismos estariam fracamente ligados à superfície por forças de Van de Waals e atrações eletrostáticas, sendo facilmente removidos. Na segunda etapa, pelo tempo de aderência (tempo-dependente) e pela formação de substâncias exopoliméricas que funcionam como uma “cola” ligando a bactéria à superfície, o fenômeno torna-se irreversível.

Busscher e Weerkamp (1987) caracterizam o processo em função da distância entre a bactéria e a superfície, e estabelecem três etapas. À distância > 50 nm, apenas forças fracas operam e a adesão é reversível. Quando a distância é próxima a 20 nm forças fracas e eletrostáticas estão atuando e esta etapa pode ser reversível, mas algumas vezes torna-se irreversível. A terceira etapa ocorre a distâncias < 15 nm onde forças adicionais se somam às ligações de Van der Waals e eletrostáticas, como a produção de polímeros adesivos que levam à adesão irreversível.

Segundo Watnick e Kolter (2000), a bactéria se aproxima da superfície e forma uma associação provisória com a superfície e/ou outros microrganismos previamente aderidos à superfície. Após esta etapa, esta associação se torna estável como parte de uma microcolônia. Finalmente, surge uma estrutura tridimensional e o biofilme é formado; então, ocasionalmente, células se desprendem do biofilme matriz (**Figura 1**).

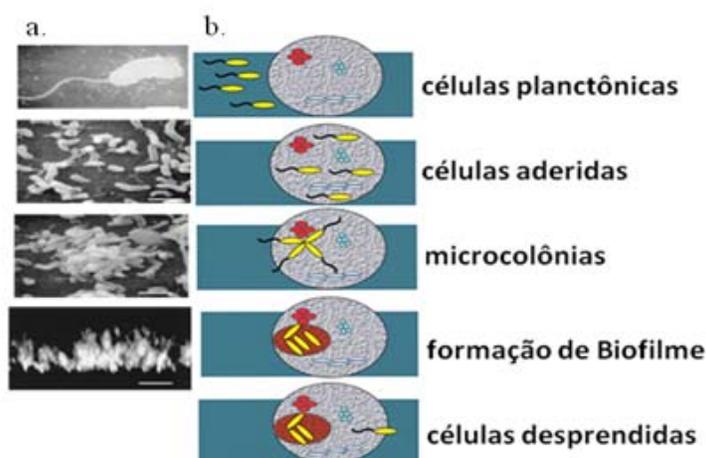


Figura 1. Etapas de formação do biofilme (a) por microscopia eletrônica e (b) esquemática.

Fonte: adaptado de Watnick e Kolter (2000).

Ademais, segundo Xavier et al. (2005), na primeira etapa ocorre o transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente fixação; na segunda etapa ocorre o crescimento e divisão de células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS; na terceira etapa, ocorre a fixação de células bacterianas planctônicas e outras partículas, contribuindo para a formação do biofilme; e na quarta etapa, a liberação de material celular segundo dois mecanismos diferentes: (a) erosão (perda de células individuais) ou (b) perda de agregados maiores (**Figura 2**).

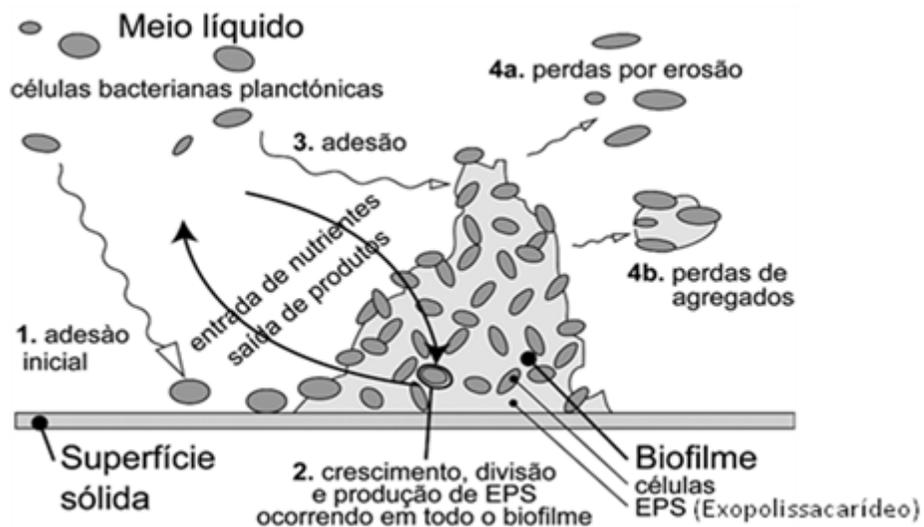


Figura 2. Processos envolvidos na formação e crescimento de biofilmes.

Fonte: adaptado de Xavier et al. (2005).

É importante observar que em todas as interpretações, existe sempre o consenso, de que ocorra uma etapa reversível e outra irreversível além da importância da presença do material extracelular como forma de propiciar a melhor adesão.

2.3. Características e fatores que influenciam a adesão microbiana e formação de biofilmes

Alguns fatores influenciam a adesão microbiana como, por exemplo, as propriedades físico-químicas da superfície inerte e da superfície microbiana, aparatos celulares (pili, flagelos e fímbrias), capacidade de produção de matriz extracelular, sistemas de comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e condições do processamento de alimentos (fluxo de líquidos e concentração de nutrientes).

Além destes fatores outros são importantes como o gênero e a espécie do microrganismo, a temperatura e as condições de crescimento (KIM; FRANK, 1995; STEPANOVIĆ et al., 2004; LINDSAY; BROZEL; VON HOLY, 2006; FOLSOM et al., 2006; SANDERS; FRANK; ARNOLD, 2008).

Os flagelos podem atuar potencialmente de alguma forma na adesão e formação de biofilmes por: i) permitir células planctônicas de transpor nutrientes associados à superfície e ii) permitir que a bactéria alcance a superfície, superando as forças repulsivas na superfície. Pratt e Kolter (1998) demonstraram que a motilidade é crítica para a formação do biofilme, sendo importante para a interação inicial com a superfície e para movimentação através da mesma.

Porém, Toutain, Caiazza e O'Toole (2004), apesar de confirmarem que a presença de flagelos parece ser um fator de sucesso para a colonização de superfícies, também afirmam que há inúmeros exemplos de aderência que são independentes da presença de flagelos.

Após o estabelecimento do biofilme, a expressão de fatores de motilidade assim como, adesina e pili são suprimidos, sugerindo que o papel destas estruturas está ligada à adesão inicial e após esta etapa inicial da formação do biofilme, estas proteínas não são mais necessárias e sua expressão é inibida (JEFFERSON, 2004). Destaca-se o fato de existirem diferenças, por exemplo, na expressão de genes, e conseqüente diferenças de fenótipos e metabolismo do microrganismo em um biofilme quando comparado ao estado planctônico,

reagindo e se adaptando ao ambiente (JEFFERSON; 2004; MONDS; O'TOOLE, 2009).

A adesão bacteriana é influenciada pelas propriedades físico-químicas das superfícies celulares, que por sua vez são influenciadas por fatores como, taxa de crescimento microbiano, meio e condições de cultivo (tempo e temperatura). As bactérias têm superfícies com cargas negativas e normalmente se comportam como partículas hidrofóbicas, mas o grau de hidrofobicidade pode mudar com a fase de crescimento (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Outro fator extremamente importante na adesão e formação de biofilmes é a característica da superfície sólida à qual os microrganismos irão aderir.

Chapas de aço inoxidável tipo AISI 304 acabamento nº4 (#4) são usualmente utilizadas na fabricação de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos. Borracha, teflon e nylon são utilizados para gaxetas, utensílios e partes de equipamentos. Além destas superfícies, destacam-se também o vidro e as superfícies de polipropileno. Estas superfícies são submetidas a repetidas e diferentes ações mecânicas nas diversas etapas de processamento e higienização, aumentando o desgaste e a possibilidade de alojar microrganismos.

A microtopografia do aço inoxidável é composta por fendas e rachaduras, que não são perceptíveis macroscopicamente, sendo apenas observadas com auxílio de técnicas de microscopia eletrônica. Estas configurações permitem a existência de abrigos em que os microrganismos podem crescer e se proteger dos processos de limpeza e sanitização (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; ZOTOLLA; SASAHARA, 1994).

O fator mais relevante na fixação e proteção dos microrganismos nas superfícies é a produção de substâncias extracelulares. Os EPS determinam as condições de vida dos microrganismos no biofilme, afetando a porosidade, densidade, conteúdo de água, propriedades de absorção e estabilidade mecânica. Estes compostos são biopolímeros que envolvem os microrganismos no biofilme. Ao contrário do que normalmente se acredita, os EPS são mais do que apenas polissacarídeos, eles compreendem adicionalmente uma grande

variedade de proteínas, glicoproteínas e glicolipídeos, sendo difícil purificar a matriz de EPS e separar seus componentes de células e outras macromoléculas associadas ao biofilme. (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007).

Os EPS também protegem as células contra estresses de ordem física como, ação mecânica, irradiações e variações de temperatura, além de sanitizantes e antimicrobianos (POULSEN, 1999).

Segundo Lehner et al. (2005) a produção de EPS é afetada pelo nível de nutrientes do meio de cultura, sendo que o excesso de carbono e a limitação de nitrogênio, potássio ou fosfato, promovem a síntese de EPS. Os autores avaliaram a produção de EPS por 56 isolados de *Enterobacter sakazakii*, dos quais 24 produziram uma massa viscosa e leitosa, considerada como polissacarídeo extracelular, e a análise por cromatografia líquida de alta eficiência revelou a presença de glicose, galactose, frutose e ácido glucurônico.

2.4. Biofilmes na indústria de alimentos

Microrganismos aderidos a superfícies de contato com alimentos podem constituir um perigo potencial pela possível contaminação cruzada no processamento desses alimentos (POULSEN, 1999; SHI; ZHU, 2009).

Diversos trabalhos descrevem a habilidade dos microrganismos de origem alimentar aderir e formar biofilmes em superfícies (GANDARA; OLIVEIRA, 2000; SHARMA; ANAND, 2002; JAIN; CHEN, 2007). Quando as células do biofilme se desprendem, os microrganismos podem contaminar os alimentos e/ou serem disseminados para outros pontos da superfície, equipamentos e ambientes (POULSEN, 1999).

Sharma e Anand (2002) avaliaram a formação de biofilmes em uma usina de pasteurização comercial de leite. Dentre os microrganismos isolados predominaram os do gênero *Bacillus*. Também foram isolados *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e espécies de *Citrobacter*, *Flavobacterium* e *Proteus*.

Jain e Chen (2007) verificaram a adesão e formação de biofilmes por cepas de *Salmonella* spp isoladas de carne de porco em superfícies de vidro e poliestireno.

Nas mais diversas indústrias de processamento de alimentos, outros microrganismos aderidos à superfícies que contatam alimentos, já foram identificados, como *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* spp, *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus* (HOOD; ZOTOLLA,1995; GUNDUZ ; TUNCEL, 2006).

Nas indústrias de alimentos devido à diversidade da produção, das matérias primas e dos produtos, pode ocorrer a formação de biofilmes por diferentes microrganismos e com comportamentos variáveis.

Em biofilme composto por multi-espécies, fato este mais comum na natureza, os produtos metabólicos de um microrganismo podem servir para a multiplicação da outra espécie e a adesão de uma espécie pode prover substâncias ligantes que permitem a adesão de outras. Todavia, a competição por nutrientes e o acúmulo de produtos tóxicos gerados podem limitar a diversidade microbiana em um biofilme.

Outro fator importante nos biofilmes multi-espécies é o aumento da estabilidade dos mesmos, bactérias que não produzem EPS podem se beneficiar destas substâncias produzidas por outros microrganismos presentes, ou mesmo com interações entre EPS produzidos por diferentes microrganismos (Mc ELDOWNEY; FLETCHER, 1987; KUMAR; ANAND, 1998; DUNNES, 2002).

Segundo Meyer (2003), existem três estratégias para se tentar solucionar os problemas dos biofilmes: i) sanitização antes da sua formação, ii) sanitização após sua formação, ou iii) utilização de materiais que não favoreçam a formação dos mesmos.

A limitação de nutrientes, a ausência de água, o uso de equipamentos com configurações higiênicas, o controle da temperatura no processamento são

condições importantes para o controle do biofilme na indústria de alimentos. Infelizmente, nem sempre estas condições estão presentes, e, portanto, o controle dos biofilmes, muitas vezes, só ocorrerá pela aplicação de um programa de higienização eficaz (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Os sanitizantes químicos mais utilizados no controle de microrganismos em superfícies de processamento na indústria de alimentos são o hipoclorito de sódio, cloraminas orgânicas, dióxido de cloro, iodóforos, compostos de amônia quaternária, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, álcool-clorexidina, etc (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Gândara e Oliveira (2000) relataram que os melhores resultados na remoção de biofilme em aço inoxidável, formado por *Streptococcus thermophilus* isolado de leite pasteurizado, foram obtidos com limpeza alcalina seguida de limpeza ácida e mais eficientemente quando se complementava a higienização com hipoclorito de sódio.

Marques et al. (2007) avaliaram a ação do dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético na inativação de células de *S. aureus* aderidas e verificaram uma maior eficiência do ácido peracético.

A prevenção e o controle da formação de biofilmes na indústria de alimentos passam pelo correto estabelecimento de programas de higienização, cuja eficácia dependerá de uma aplicação integrada às outras ferramentas de controle de qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), o Sistema de Análise e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e ISO: 9000 (SHARMA; ANAND, 2002; SHI; ZHU, 2009).

3. Sistema *Quorum sensing*

O termo *quorum sensing* foi apresentado pela primeira vez em 1994 por Fuqua et al., ao descrever o fenômeno em que as bactérias comunicam entre si, utilizando moléculas sinalizadoras que são liberadas no ambiente durante a sua multiplicação. As bactérias são capazes de detectar a concentração destas

moléculas no ambiente e quando estas alcançam um nível determinado, ativam inúmeras respostas celulares (GRIFFITHS, 2005).

Quorum sensing é um mecanismo de sinalização célula-célula que pode modular algumas funções celulares, incluindo produção de bacteriocina, fatores de virulência e formação de biofilme. A regulação desse sistema é mediada pelo acúmulo de uma ou mais classes de moléculas sinalizadoras produzidas pela célula bacteriana e excretadas para o meio externo denominados autoindutores (AI). Estas moléculas quando atingem uma concentração crítica são detectadas pelas bactérias que respondem a este sinal, alterando a expressão de determinados genes (WATERS; BASSLER, 2005; READING; SPERANDIO, 2006).

Sabe-se que há várias “linguagens” utilizadas pelas bactérias, dependendo se a comunicação é entre o próprio gênero (diferentes ou mesma espécie), com diferentes gêneros ou com o hospedeiro (GRIFFITHS, 2005).

Alguns sistemas de *quorum sensing* utilizados por bactérias já foram descritos: (1) sistema tipo LuxR/I, sendo este utilizado por bactérias Gram negativas, no qual as moléculas sinalizadoras são as acil homoserinas lactonas (AI-1); (2) a sinalização por peptídeos, utilizada por bactérias Gram positivas; (3) a sinalização tipo LuxS/AI₂, utilizada tanto por bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, para comunicação interespecie; e (4) sistema de comunicação AI₃/epinefrina/norepinefrina (READING; SPERANDIO, 2006).

O sistema LuxR/I foi descrito primeiramente em *Vibrio fischeri*. A emissão de luz por este microrganismo depende da transcrição do operon da luciferase que é regulado por duas proteínas, a LuxI, responsável pela produção do autoindutor AI-1 e LuxR que é ativado pela molécula sinalizadora (AI-1) para aumentar a transcrição do operon da luciferase. A partir desta descrição, homólogos de LuxI-LuxR já foram identificadas em inúmeras outras bactérias Gram negativas, e em todos estes sistemas LuxI-LuxR, a bactéria produz uma molécula sinalizadora acil homoserina lactona que se liga a proteína LuxR e regula a transcrição de inúmeros fenótipos, como por exemplo, a produção de antibióticos em *Erwinia*,

motilidade em *Yersinia pseudotuberculosis*, formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros (**Tabela 1**). As acil homoserina lactonas têm um anel homoserina lactona ligado por uma amida a uma cadeia acil variável, que podem variar em números de carbono (de quatro a dezoito carbonos) (WHITEHEAD et al., 2001; GRIFFITHS, 2005; READING; SPERANDIO, 2006).

As bactérias Gram positivas utilizam pequenos peptídeos para a comunicação célula-célula. Estes peptídeos são normalmente produtos de oligopeptídeos. O sistema já foi descrito em algumas bactérias Gram positivas como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Bacillus subtilis*.

Na sinalização tipo LuxS/AI₂, a estrutura do autoindutor AI-2 é um furanosil borato diéster, sintetizado pela proteína LuxS. O sistema *luxS/AI₂* já foi identificado em mais de 55 espécies bacterianas tanto Gram positivas quanto Gram negativas. O autoindutor AI-2 é utilizado para comunicação inter-espécies (XAVIER; BASSLER, 2003; READING; SPERANDIO, 2006; WALTERS, 2006).

O autoindutor AI-3 ainda não tem a estrutura caracterizada, análises sugerem que este sinal é um composto aromático, e que além de estar envolvido em sinalização interespecies, tem papel na comunicação inter reino, podendo estar envolvido na comunicação entre células do hospedeiro com as células bacterianas, pelos sinais com os hormônios eucarióticos epinefrina e norepinefrina, ambos presentes no trato gastrointestinal (SPERANDIO et al., 2003; READING; SPERANDIO, 2006).

A atividade do autoindutor AI-3 já foi observada em sobrenadantes de cepas de *E. coli* sorogrupos O26:H11 e O111 ac:H9, *Shigella* sp, *Salmonella*, *E. coli* comensal, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (READING; SPERANDIO, 2006; WALTERS, 2006).

A ocorrência do sistema *quorum sensing* em bactérias deterioradoras e patogênicas nos alimentos já foi demonstrada. (SMITH, FRATAMICO, NOVAC; 2004; CHRISTENSEN et al., 2003; FLOGAARD et al., 2003 ; GRAM et al., 2002, GRAM et al., 1999).

Gram et al. (1999) revelaram que 116 cepas psicrotóficas de enterobactérias isoladas de salmão defumado refrigerado e salmão resfriado embalado à vácuo produziram acil homoserinas lactonas. Verificaram que houve a produção destas moléculas na carne inoculada com uma população de 6 logUFC/g de enterobactérias. Ressalta-se que os pesquisadores também detectaram a presença das moléculas sinalizadoras em salmão refrigerado embalado a vácuo não inoculado, ou seja, naturalmente contaminado (com populações variando de 5 a 7 log UFC/g). Este fato indica que essas moléculas sinalizadoras podem estar relacionadas à regulação de fenótipos importantes para a deterioração de alimentos.

Tabela1. Bactérias de origem alimentar que possuem homólogos ao gene *luxI* e *luxR* de *Vibrio fischeri*.

Microrganismo	Homologo Lux R/I	Autoindutor identificado	Fenótipo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AhyR, Ahyl	C4-HSL	Protease extracelular; formação de biofilme
<i>Enterobacter agglomerans</i>	EagR, EagI	3-oxo C6 HSL	Desconhecido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasR, Las I	3-oxo-C12-HSL	Exoenzimas; formação de biofilmes, entre outras
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RhIR, RhII	C4-HSL	Exoenzimas, piocianina, pili
<i>Ps fluorescens</i>	PhzR, PhzI	Desconhecido	Antibiótico fenazina
<i>Serratia liquefaciens</i>	SwrR, SwrI	C4-HSL	Proteases, exoenzimas
<i>Serratia liquefaciens</i>	BsmA, BsmB	Desconhecido	Formação de biofilmes
<i>Vibrio cholerae</i>	HapR	Desconhecido	Formação de biofilme
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yen R, YenI	C6-HSL	Virulência?

Fonte: adaptado de (GRIFFITHS, 2005).

Flodgaard et al. (2003) investigaram a influência de diferentes fontes de carbono, temperatura, concentração de sal, pH e bactérias ácido lácticas da

microbiota de salmão defumado refrigerado, no perfil e taxa de produção de acil homoserinas lactonas por duas enterobactérias (*Serratia proteamaculans* e *Enterobacter agglomerans*) isoladas de salmão defumado refrigerado. Os pesquisadores observaram que as duas cepas produziam os mesmos tipos e quantidade de acil homoserinas lactonas sob todas as condições estudadas. É importante ressaltar a produção das moléculas sinalizadoras em condições reais dos alimentos e não apenas laboratorial, em condições ótimas para a produção das moléculas.

Os estudos de sistemas *quorum sensing* ainda são recentes e muitas pesquisas devem ser realizadas para novas descobertas e entendimento desta forma de comunicação, cujos fenômenos podem estar relacionados a diversos fenótipos importantes das bactérias.

4. Sistema *Quorum quenching*

A interferência e a ruptura do sistema *quorum sensing* é denominado como sistema *quorum quenching* (ZHANG, 2003; ULRICH, 2004; MARTINEZ et al., 2007).

Alguns mecanismos que interferem nesse sistema de comunicação têm sido descritos. Os mais estudados são as lactonases, acilases e furanonas, embora haja alguns trabalhos que indicam outras substâncias como possíveis interferentes no sistema *quorum sensing* (ZHANG, 2003; RASMUSSEN et al., 2005; CHOO; RUKAYADI; HWANG, 2006).

Alguns microrganismos, como por exemplo, do gênero *Bacillus* produzem a enzima lactonase, que tem a capacidade de degradar as moléculas sinalizadoras acil homoserinas lactonas, pela quebra do anel lactona. A presença da enzima acil homoserina lactonase tem sido evidenciada em *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* e *Bacillus mycoides*. Estas enzimas são codificadas pelo gene *aiiA* (DONG et al., 2002; SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004).

Ulrich (2004), demonstrou que a expressão da *aiiA* lactonase de *B. anthracis* em *B. thailandensis*, eliminou completamente as moléculas sinalizadoras C8-HSL e C10-HSL, e reduziu os níveis de C6-HSL, causando, por exemplo, o aumento do tempo de geração celular. Em contrapartida, a expressão da *aiiA* lactonase de *B. cereus* A24, em *B. thailandensis*, reduziu as concentrações de C6-HSL, C8-HSL e C10-HSL a níveis não detectáveis, causando alteração na motilidade, entre outras.

Martinez et al. (2007) realizaram cultivo misto de um microrganismo produtor de acil homoserina lactona (*Yersinia enterocolitica*) com um produtor de molécula que degrada as acil homoserinas lactonas (*B. cereus*) em meio de cultura e extrato de carne de porco, simulando um alimento. Os autores demonstraram que houve a degradação da molécula indutora de *quorum sensing* (N-acil homoserina) e ressaltam que bactérias, como *B. cereus*, poderiam utilizar o mecanismo de degradação das moléculas sinalizadoras como uma vantagem competitiva e ajudá-las a dominar seu ambiente.

Outro mecanismo enzimático relatado é o das acil homoserinas acilases que hidrolisam a ligação amida entre a cadeia de ácido graxo e a cadeia de homoserina lactona das moléculas sinalizadoras. Estas enzimas são codificadas pelo gene *aiiD* (ZHANG, 2003).

As furanonas halogenadas, também participam da quebra do sistema *quorum sensing*. Já foi demonstrado a inibição de inúmeros fenótipos controlados por *quorum sensing* por estas moléculas, incluindo produção de toxinas e bioluminescência (ZHANG, 2003; GRIFFITHS, 2005).

Pelos inúmeros fatores importantes regulados pelo sistema *quorum sensing* e seus impactos, o bloqueio deste sistema pela utilização de substâncias inibidoras pode trazer grandes benefícios na área médica, ambiental, agrícola e alimentar.

5. Referencias bibliográficas

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**. v.28, p.145-155, 1995.

ANDRADE, N.J.; BRIDEGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p.833-838, 1998.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos - Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela. 410p, 2008.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo(SP): Varela. 410p, 2008.

BAR-OZ, B., PREMINGER, A., PELEG, O., BLOCK, C., Arad, I. Clinical observation *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. **Acta Paediatrica**, v. 90, p. 336–358, 2001.

BECKER,H; SCHALLE,G; VON WIESE, W; TERPLAN,G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 23, n. 1, p. 1-15, 1994.

BENNET,R. W.; BELAY,N. *Bacillus cereus* .In: .APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ° ed. Washington: APHA, 32, p.311-316, 2001.

BIERING, G., S. KARLSSON, N. C. CLARK, K. E. JONSDOTTIR, P. LUDVIGSSON, AND O. STEINGRIMSSON. Three cases of neonatal meningitis

caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p.2054–2056, 1989.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998**. Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento, 1998.

BUSSCHER, H.J. ; WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Letters**, n. 46,p.165-173, 1987.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Inst. Food. Technol.**, v.2, p.22-32, 2003.

CHOO,J.H.;RUKAYADI,Y.; HWANG,K. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. **Letters in Applied Microbiology**. v. 42, p. 637-641, 2006.

CHRISTENSEN,A.B, RIEDEL, K., EBERL, L., FLODGAARD, L.R., MOLIN,S., GRAM,L. GIVSKOV,M. Quorum sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. **Microbiology**, v. 149,p.471-483, 2003.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SOCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Ann. Rev. Microbiol**, v. 49.p.711-745, 1995.

DONG, Y. H., GUSTI, A. R., ZHANG, Q., XU, J. L.; ZHANG, L. H. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology** v.68,p. 1754–9, 2002.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surface. **Emerging Infectious Diseases**. v.8.n.9. September, 2002.

DUNNES, W.M.J. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Apr, p. 155–166, v. 15, n. 2, 2002.

FAO/WHO FOOD STANDARD. Codex alimentarius Official Standards. Official Codex Standard. List CAC/RCP 66- 2008. **CODE OF HYGIENIC PRACTICE FOR POWDERED FORMULAE FOR INFANTS AND YOUNG CHILDREN**.

Disponível em:

www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/CXP_066e.pdf Acesso em : dezembro 2009.

FLEMMING, H.C; NEU, T.R; WOZNIAK, D. J. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. **Journal of Bacteriology**, p. 7945–7947, 2007.

FLODGAARD, L.R, CHRISTENSEN, A.B., MOLIN, S., GIVSKOV, M., GRAM, L. Influence of food preservation parameters and associated microbiota on production rate, profile and stability of acylated homoserine lactones from food-derived Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p.145-156, 2003.

FOLSOM, J.P; SIRAGUSA, G.R ; FRANK, J.F. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 4, p. 826–834, 2006.

GANDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, 2000.

GRAM, L., CHRISTENSEN, A.B., RAVN, L., GIVSON, M. Production of acylate homoserine lactones by psychotropic members of the Enterobacteriaceae isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.8, p.3458-3463, 1999.

GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B. Food spoilage- interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n.8, p.79-97, 2002.

GRIFFITHS, M. Quorum sensing. In: M. Griffiths. **Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance**. Woodhead July 2005 . Cap.22, p.580-640.

GUNDUZ, G. T.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89, p. 329-336, 2006.

GURTLER, J. B.; KORNACKI, J.L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.1-34, 2005.

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

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**.v.14, n. 11, p.443-454, 2003.

IVERSEN, C., LANE, M.; FORSYTHE, S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, n. 5, p.378-382, 2004.

IVERSEN, C., MULLANE, M., MCCARDELL, B., TALL, B.D., LEHNER, A., FANNING, S., STEPHAN, R. and JOOSTEN, H. *Cronobacter* *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis*, sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *Lactaridi* subsp. nov. **International Journal System Environmental Microbiology**, v.58, p.1442–1447. 2008.

JAIN, S; CHEN, J. Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of *Salmonella* as Influenced by Cellulose Production and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis. **Journal of Food Protection**., v. 70, n.11, p.2473–2479, 2007.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p.163–173, 2004.

KIM, K.Y.; FRANK, J.F. Effect of Nutrients on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p. 24-28, 1995.

KIM,H; RYU,J-H; BEUCHAT,L.R. Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, Dried on the Surface of Stainless Steel, and in a Biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n4, p. 1256–1265, 2007.

KIM,H; RYU,J-H; BEUCHAT,L.R. Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. **International Journal of Food Microbiology** , 111,p. 134–143, 2006.

KUMAR, C.G; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9–27, 1998.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**. v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005

LEHNER, A.; STEPHAN, R. Microbiological, Epidemiological, and Food Safety Aspects of *Enterobacter sakazakii* . **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 12, p. 2850-2857, 2004.

LINDSAY, D; BROZEL, V. S; VON HOLY, A. Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1168–1172, 2006.

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

MARTINEZ, M.S.M. ;UYTTENDAELE, M. ; RAJKOVIC, A. ; NADAL, P.; DEBEVERE, J. Degradation of *N*-Acyl-L-Homoserine Lactones by *Bacillus cereus* in Culture Media and Pork Extract. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2329–2332, 2007.

Mc ELDOWNEY,S; FLETCHER,M. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. **Archives of Microbiology**. n.148,p.57-62,1987.

- MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration Biodegradation**, Barking, v.51, p.249-253, 2003.
- MONDS,R.D.; O´TOOLE, G.A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**.v.17,n.2,p. 73-87, 2009.
- MULLANE, N., HEALY, B., MEADE, J., WHYTE, P., WALL, P.G. AND FANNING, S. Dissemination of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* in a powdered milk production manufacturing facility. **Applied Environmental Microbiology**.v. 74, p.5913–5917, 2008.
- NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. **Letters in Applied Microbiology**. v.24,p.9-13. 1997
- O´TOOLE, G.A; GHANNOUM,M. Introduction to Biofilms: Conceptual Themes. In: GHANNOUM,M; O´TOOLE, G.A. **Microbial biofilms**. Washington, D.C: ASM Press, p.1-3, 2004.
- PALCICH, G; GILLIO,C.M; ARAGON-ALEGRO,L.C; PAGOTTO,F.J; FARBER,J.M.; LANDGRAF,M; DESTRO,M.T. *Enterobacter sakazakii* in Dried Infant Formulas and Milk Kitchens of Maternity Wards in São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 72, n 1, p.37–42, 2009.
- POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensm.- Wiss.u-Technology**, vol. 32, p. 321-326, 1999.
- PRATT, L.A.;R. KOLTER. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**. v. 30(2),p.285-93, 1998
- RASMUSSEN,T.B; SKINDERSOE,M.E.; BJARNSHOLT,T.; PHIPPS,R.K.; CHRISTENSEN,K.B.; JENSEN,P.O.; ANDERSEN,J.B.; KOCH,B.; LARSEN,T.O.;HENTZER,M.; EBERL,L.; HOIBY,L.; GIVSKOV,M. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. **Microbiology** .n. 151, p.1325–1340, 2005.

- READING, N.C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**,v. 254 ,p.1–11, 2006.
- REYES,J.E., BASTIAS, J.M., GUTIERREZ,M.R., RODRIGUEZ,M.O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. **Food Microbiology**, v.24,n.1,p.1-6,2007.
- RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.
- SANDERS, S. Q.; FRANK, J. F.; ARNOLD, J.W. Temperature and nutrient effects on *Campylobacter jejuni* attachment on multispecies biofilms on stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 2, p. 271–278, 2008.
- SANTOS, R.F.S. Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades da região de Campinas/SP. Campinas. 91p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos) **Faculdade Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Revista Microbiologia in foco-** Sociedade Brasileira de Microbiologia, n.2,p.4-12, 2007.
- SCHOENI,J.L.;WONG,A.C.L. Bacillus cereus Food Poisoning and its Toxins. **Journal of Food Protection**,v.68,n.3,p.636-648,2005.
- SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, v.13, p.469-477, 2002.
- SHI,X.;ZHU. X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.054,2009.
- SMITH,J.L; FRATAMICOMP.M; NOVACK,J.S. Quorum sensing: A primer for food Microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Bacteria-host communication: The language of hormones **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p. 8951-8956, 2003.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428–432, 2004.

TOUTAIN, C.M; CAIAZZA, N.C; O`TOOLE, G.A. Molecular basis of biofilm development by Pseudomonads. In: GHANNOUM, M; O`TOOLE, G.A. **Microbial biofilms** ASM Press, p.43-63, 2004.

ULRICH, R.L. *quorum quenching*: Enzymatic Disruption of *N*-Acylhomoserine Lactone-Mediated Bacterial Communication in *Burkholderia thailandensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.10, p.6173 – 6180, 2004.

UNITED STATES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2007). **FDA 101: Infant Formula**. disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm048694.htm#SafetyIssues>. Acesso em dezembro 2009.

VAN ACKER, J., DE SMET, F., MUYLDERMANS, G., BOUGATEF, A., NAESSENS, A. AND LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.293–297, 2001.

VARGAS-LEGUA`S, H ; RODRIGUEZ GARRIDO, V.; LORITE CUENCA, R ; C. PEREZ-PORTABELLA, C. REDECILLAS FERREIRO, M ; CAMPINS MARTI, M. Guia para la elaboracion de formulas infantiles em polvo en el médio hospitalario. Sistema de analisis de peligros y puntos de control critico. **Anales de Pediatría** v.70,n.6,p.586–593, 2009.

WALTERS, M. **Regulation of the EHEC LEE pathogenicity island by bacterial and host signaling**. Dallas, Texas June, 2006. Thesis for the Degree of Doctor of philosophy. Faculty of the Graduate School of Biomedical Sciences. University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas.

WATERS,C.M, BASSLER, B. Quorum sensing: cell-to-cell Communication in Bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.21, p.319-346, 2005.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview – Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 2675-2679, 2000.

WHITEHEAD, N. A., BARNARD, A. M. L., SLATER, H., SIMPSON, N. J.L., SALMOND, G. P. C. Quorum sensing in Gram negative bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, 25, 365-404, 2001.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. **Current Opinion in Microbiology**,v. 6, p.191-197, 2003.

XAVIER,J.B., PICIOREANU,C., ALMEIDA,J.S., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, 2005. Disponível em: <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf>.

ZHANG,L.H. Quorum quenching and proactive host defense. **Trends in Plant Science**. v.8,n.5, 2003

ZINK, D. **Powdered infant formula: an overview of manufacturing processes**. 2003. Disponível em: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3939b1_tab4b.pdf. Acessado: dezembro de 2009.

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

CAPÍTULO II - Formação de biofilmes mono e multi-espécies de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável e sua inativação por sanitizantes químicos

Resumo

A contaminação de fórmulas infantis desidratadas por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* pode ter como origem o contato do alimento com biofilmes formados em ambientes, utensílios e equipamentos empregados na sua produção e posterior reconstituição nos locais de utilização. Neste trabalho avaliou-se: i) a dinâmica de formação de biofilmes mono e multi-espécies de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* em superfície de aço inoxidável utilizando-se como meios de cultivos fórmula infantil (FI) e caldo Luria Bertani (LB) e, ii) a eficácia de soluções de ácido peracético e de hipoclorito de sódio na inativação destes biofilmes. A formação de biofilmes ocorreu de forma mais intensa em meio FI do que LB, fato esse relevante pois a FI é o mais conhecido e importante veículo de transmissão de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). A contagem de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) tanto em cultivo mono quanto em multi-espécies superou o de *B. cereus* e para ambos, o maior desenvolvimento ocorreu em cultivos mono-espécie. Nos ensaios onde biofilmes de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* foram produzidos em caldo LB isoladamente e em cultura mista, independente do tempo de formação, as contagens foram reduzidas a níveis inferiores a 1 logUFC/cm² após exposição a soluções de ácido peracético ([500mg/L]) e hipoclorito de sódio ([100mg/L]) por 15 minutos. No entanto, para os biofilmes produzidos em FI ocorreram diferentes situações com contagens de microrganismos em alguns tempos mesmo após o contato com as soluções de sanitizantes. Assim, os resultados revelaram a influência do meio de cultivo na formação de biofilme e sua resistência a sanitizantes e a importância da realização de processos de higienização de superfícies o mais próximo do término do processamento ou reconstituição destes alimentos.

Palavras chaves: Biofilmes bacterianos, *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Bacillus cereus*, fórmula infantil, sanitização.

Summary

The contamination of dried infant formulas by *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *Bacillus cereus* may originate from contact of the food with biofilms formed in the environment and on the utensils and equipment employed in their production and subsequent reconstitution when used. In this study the following were evaluated: i) the dynamics of the formation of mono and multi-species biofilms of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *Bacillus cereus* on stainless steel surfaces, using the infant formula (FI) and Luria Bertani broth (LB) as the culture media and, ii) the efficacy of peracetic acid and sodium hypochlorite solutions in the inactivation of these films. Biofilm formation was more intense when using FI as the culture medium as compared to the use of LB, this fact being highly relevant, since FI is better known as an important vehicle in the transmission of *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). In both mono and multi-species biofilm it was observed that the growth of *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) was greater than that of *Bacillus cereus* and that both microorganisms developed better as a mono-species. For all the biofilms of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *Bacillus cereus*, both mono and in mixed culture, produced in the LB broth, and independent of the formation time, the counts were reduced to levels below 1 log CFU/cm² when in contact with peracetic acid ([500mg/L]) or sodium hypochlorite ([100mg/L]). However for the biofilms produced in the infant formula, many situations occurred, with counts more than 1 log CFU/cm² in some situations after the contact with sanitizers. These results showed the influence of culture medium in biofilm formation and its resistance to sanitizers, highlighting the need for an efficient sanitization of the surfaces as soon as the processing or reconstitution of these foods.

Keywords: Microbial biofilms, *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Bacillus cereus*, infant formula, sanitization.

1. INTRODUÇÃO

Enterobacter sakazakii é uma bactéria patogênica emergente, Gram negativa, não formadora de esporos, formadora de cápsulas de material polissacarídeo, que tem sido associada a diversos surtos e casos de meningites principalmente em neonatos, podendo causar também enterocolite necrozante, bacteremia e septicemia. Por esta razão, tem aumentado a preocupação por parte das autoridades de saúde pública de diversos países em relação a este microrganismo (IVERSEN; FORSYTHE, 2003; GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005). Recentemente, a taxonomia de *Enterobacter sakazakii* foi alterada com a criação do gênero *Cronobacter*, que agrupa seis espécies (IVERSEN et al., 2008). O Codex Alimentarius adotou o uso de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) nos textos da então denominada *Enterobacter sakazakii* (FAO/WHO, 2008). No presente trabalho, esta denominação também foi adotada.

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) têm sido isolado de inúmeras fontes alimentares, ambientais e clínica, porém fórmula infantil tem sido o principal veículo de transmissão (MULLANE et al., 2008; IVERSEN; FORSYTHE, 2003; GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005). Fórmula infantil desidratada já foi epidemiologicamente identificada como fonte de infecções por *Enterobacter sakazakii* em surtos de meningite neonatal e em surto de enterocolite necrozante (BIERING et al., 1989; VAN ACKER et al., 2001).

Outro microrganismo de importância encontrado nas indústrias de fórmulas infantis desidratadas, e em ambientes de manipulação destas, é a bactéria *Bacillus cereus*, em formato de bastonete, Gram positiva, produtora de esporos termorresistentes, amplamente disseminada no meio ambiente e de difícil eliminação durante o processamento (ANDERSSON et al., 1995). Produtos lácteos desidratados e fórmulas infantis são reconhecidamente fontes constantes de contaminação por *Bacillus cereus* (BECKER et al., 1994).

As bactérias presentes nos alimentos podem aderir e multiplicar nas superfícies formando biofilmes microbianos, que possuem potencial de atuar como fonte crônica de contaminação tanto no alimento como no ambiente

comprometendo a qualidade do alimento e pode também representar graves riscos à saúde pública.

Infecções de neonatais foram associadas à colonização de *E. sakazakii* em liquidificador utilizado no preparo de fórmulas infantis reconstituídas (BAR-OZ et al., 2001).

Os biofilmes microbianos são definidos como uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, aderidos entre si e/ou a uma superfície ou interface envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos (COSTERTON et al., 1995).

Schneider em 2007 propôs uma nova definição para os biofilmes abrangendo os microrganismos que não produzem a matriz de exopolímeros. Segundo o autor “biofilmes são comunidades de microrganismos, aderidas a superfícies ou suspensas em solução, cujas células podem ou não estar envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes”.

As superfícies dos equipamentos utilizados no processamento, na manipulação e armazenamento de alimentos são reconhecidas como uma das maiores fontes de contaminação microbiana (WONG, 1998).

Um fato muito importante é que o desenvolvimento de células em biofilme promove a expressão de propriedades distintas das células planctônicas, uma das quais é o aumento da resistência aos sanitizantes (HOOD; ZOTTOLA, 1995; KIM; RYU; BEUCHAT, 2007).

Biofilmes formados por microrganismos patogênicos têm sido considerados de grande importância no contexto de segurança alimentar despertando o interesse da comunidade científica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de biofilmes mono e multi-espécies formados por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* em aço inoxidável 304, material amplamente utilizado nos equipamentos de produção de alimentos e a eficiência dos sanitizantes ácido peracético e hipoclorito de sódio na inativação destes biofilmes.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras bacterianas e condições de cultivo

A formação de biofilmes em superfícies de cupons de aço inoxidável foi avaliada para dois microrganismos isoladamente e para a cultura mista destes:

- *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), isolada de mamadeira de um berçário da região da Grande SP, ribotipo DUP 18623, cedido pelo Laboratório de Microbiologia – FCF/USP- São Paulo.
- *Bacillus cereus* ATCC 14597 cepa da coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação- FEA-UNICAMP.

A identificação destes microrganismos foi confirmada através de testes bioquímicos, morfológicos e da semeadura em meios seletivos, diferenciais e cromogênicos: - para *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.): *Enterobacter sakazakii isolation ágar* (ESIA, AES)-, *Druggan-Forsythe-Iversen ágar* (DFI, Oxoid), e Chromocult *Enterobacter sakazakii* Agar (Merck); -para *Bacillus cereus*: *Mannitol Yolk Polymyxin ágar* (MYP, Difco). Os microrganismos foram mantidos a temperatura de -80°C em tubo Eppendorf contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) adicionado de glicerol (80:20). Em cada experimento, cada cultura foi ativada e repicada por duas vezes consecutivas em 10 mL de caldo BHI e incubada a 35 ±1 °C por 24 horas.

2.2. Preparo dos cupons de aço inoxidável

Chapas de aço inoxidável AISI 304 com acabamento número 4 (#4) nas duas faces foram adquiridas na empresa Açomedi Aços Ltda (Barueri-SP). O material com estas especificações é o mais utilizado pela indústria de alimentos na construção de equipamentos, bancadas e utensílios em geral. A confecção dos cupons com dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm foi realizada pelo Centro de Tecnologia da UNICAMP e a determinação da rugosidade do material, em seu Laboratório de Metrologia, utilizando-se rugosímetro (modelo S8P, Perthen). O resultado da análise de rugosidade foi obtido a partir da média de nove medições realizadas a temperatura de 20 ± 1°C.

Os cupons foram submetidos aos seguintes procedimentos: a) limpeza manual com auxílio de esponja de poliuretano, água e detergente neutro líquido; b) enxágüe com água destilada; c) imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente; d) enxágüe com água destilada; e) esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

2.3. Formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável utilizando fórmula infantil e meio de cultura LB

Cada cupom de aço inoxidável estéril foi imerso em um poço de placa de poliestireno para cultura de células de 12 poços com fundo chato, tampa e estéril, contendo 3 mL de caldo LB (bacto triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L) e 3 mL de fórmula infantil (FI) para lactentes de 0 a 6 meses adquirida comercialmente (marca A, **ANEXO**), reconstituída segundo instruções do fabricante e esterilizada a 121 °C por 15 minutos (OH; CHEN; KANG, 2007) com suspensão de células de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* ATCC 14579 e cultivo misto das duas bactérias em volume suficiente para que cada poço contivesse concentração final de aproximadamente 10^3 UFC/mL. Essa população foi verificada, em todos os experimentos, por semeadura em placas contendo *Trypticase Soy Agar* (TSA). A formação de biofilmes microbianos foi avaliada a temperatura de 25 °C, simulando a temperatura ambiente, na qual normalmente as fórmulas são preparadas e/ou reconstituídas. Os cupons (3 para cada amostragem) foram retirados após 0 hora, 24 horas, 5 dias, 10 dias e 15 dias de incubação a 25 °C. Os meios LB e FI foram substituídos a cada três dias. Como controle (branco) utilizou-se cupons imersos nos meios de cultivo (LB e FI) estéreis não inoculados. O pH do meio inoculado e do meio de cultura controle foi verificado a cada tempo com a utilização de tiras indicadoras de pH 0 - 14 (MERCK). Os experimentos foram realizados em triplicata em três repetições independentes.

2.4. Determinação do número de células sésseis

Os cupons de aço inoxidável foram retirados dos meios de cultivo (LB e FI) com o auxílio de uma pinça estéril e foram imersos em 10 mL de *Phosphate Buffer Salt* (PBS), por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de PBS e agitados em vortex, durante 2 minutos para remoção de células sésseis (PARIZZI *et al.*, 2004 modificado). Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri com ágar *Trypticase Soy Agar* (TSA, Oxoid) e ágar MYP, incubadas a 35 °C/ 48 horas. Determinou-se o número de UFC/cm².

2.5. Avaliação da formação dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

A avaliação da formação dos biofilmes bacterianos, nas superfícies dos cupons, foi realizada utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/UNICAMP. Os cupons previamente submetidos ao contato com os microrganismos teste foram imersos em água peptonada 0,1% (p/v) por duas vezes consecutivas para retirada das células não aderidas. Para fixação das bactérias aderidas foi utilizada solução de glutaraldeído 2% e tampão fosfato 0,1M (1:1 v/v). Os cupons foram lavados em solução de tampão fosfato 0,1M e água destilada (1:1 v/v).

O procedimento de desidratação foi realizado utilizando-se álcool etílico P.A. nas concentrações de 30, 50, 70, 80, 95% (v/v), com 10 minutos de tempo de contato em cada concentração, e a 100% de etanol em três repetições por 15 minutos cada. Os cupons foram transferidos para o secador de Ponto Crítico “Critical Point Dryer” (modelo CPD 030, marca Balzers) com utilização de gás carbônico para completa remoção do álcool. Após a secagem, os cupons foram submetidos a metalização com fina camada de ouro por 2 minutos no aparelho “Sputter Coater” (modelo SCD 050, marca Balzers).

Os cupons foram então observados em microscópio eletrônico de varredura (modelo JSM 5800LV, marca JEOL) com aumentos que variaram de

800 a 8000 vezes. Para verificação da topografia da superfície do aço inoxidável em seu estado “limpo”, utilizaram-se cupons não inoculados.

2.6. Avaliação da eficiência de sanitizantes na remoção dos biofilmes

2.6.1. Preparo das soluções de sanitizantes

Foram utilizadas soluções de hipoclorito de sódio (Divosan Hypochlorite®, Jonhson Diversey) a 100 mg.L^{-1} de Cloro Residual Total (CRT) pH=9,4 e de ácido peracético (Divosan Forte®, Jonhson Diversey) a 500 mg.L^{-1} de ácido peracético (APA) pH=2,8. No preparo das soluções foi utilizada água destilada estéril. A concentração CRT da solução clorada foi avaliada em cada experimento de acordo com a metodologia da American Public Health Association – APHA (APHA,1985). A solução de ácido peracético foi preparada de acordo com a indicação do fabricante, assim como a confirmação da concentração (por iodometria) em cada experimento (JOHNSON DIVERSEY, 2002).

2.6.2. Aplicação da solução de sanitizantes

Os cupons foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça esterilizada e imersos em 10 mL de PBS por 1 minuto e enxaguados com água peptonada 0,1% para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos contendo 10mL das soluções sanitizantes. Após o tempo de contato de 15 minutos os cupons foram transferidos para tubos contendo 5 mL de PBS adicionado de tiosulfato de sódio a 1%, para a inativação da ação do sanitizante.

Os cupons foram agitados em vortex por dois minutos para remoção das células sésseis. Foram preparadas as diluições apropriadas que foram semeadas por profundidade em ágar TSA, seguido de incubação a $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por $48 \pm 1 \text{ h}$. Foi realizada simultaneamente a enumeração da população dos cupons controles, ou seja, aqueles que não receberam o sanitizante. Esta contagem foi utilizada para avaliar o efeito dos sanitizantes sobre os biofilmes formados.

2.7. Análises estatísticas

Para a avaliação estatística dos dados obtidos foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA). A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Nos grupos em que foram constatadas diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados das análises estatísticas dos dados foram obtidos via software Statistical Analysis Systems (SAS) versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Formação de biofilme em superfície de aço inoxidável utilizando meios de cultura Luria Bertani e fórmula infantil

A evolução do número de células sésseis aderidas à superfície de aço inoxidável após remoção das células planctônicas, caracterizando a formação de biofilmes de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* é apresentada nas **Figuras 1 e 2**.

De uma forma geral, a contagem de células de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) sobre superfícies de aço inoxidável atinge valores superiores a 4 log UFC/cm² após 24 horas de contato evoluindo, após 5 dias, praticamente para os níveis mais elevados, tanto em caldo LB quanto FI.

Para os ensaios com *B. cereus* em cultivos isolado ou multi-espécie observa-se que o desenvolvimento da população de células sésseis aderidas é menor comparado ao *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.).

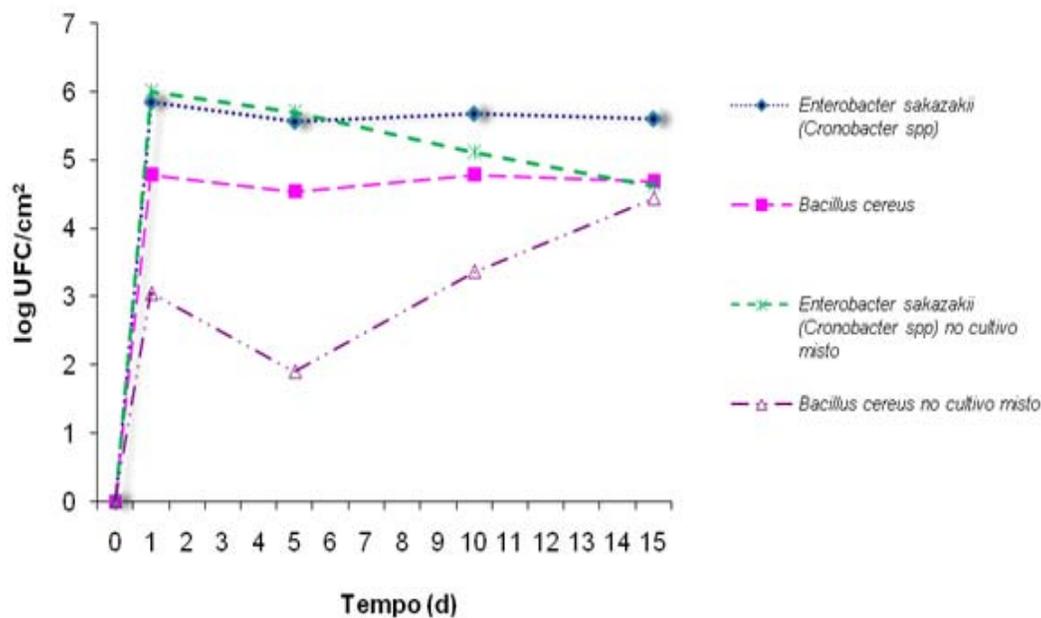


Figura 1. Evolução da população (log UFC/cm²) de células sésseis de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4, em cultivos isolados e misto em caldo Luria Bertani. Cada ponto corresponde à média de três repetições em triplicata.

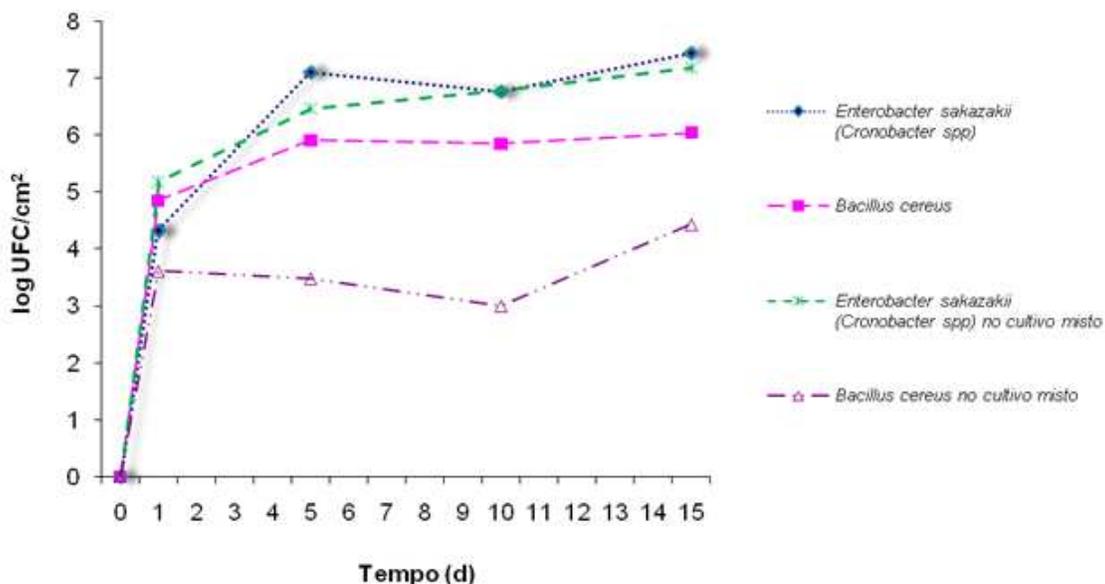


Figura 2. Evolução da população (log UFC/cm²) de células sésseis de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4, em cultivos isolados e misto em fórmula infantil reconstituída. Cada ponto corresponde à média de três repetições em triplicata.

Quanto ao meio de cultivo verifica-se um maior desenvolvimento da população de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) nas superfícies de aço inoxidável em contato com a fórmula infantil. Nesta situação a competição com *B. cereus* em cultivo multi-espécie é muito mais favorável a *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) (**Figura 2**).

Ao longo do desenvolvimento dos biofilmes sobre cupons de aço inoxidável observou-se algumas mudanças de pH nos meios de cultivo dependendo do microrganismo inoculado.

O caldo Luria Bertani não inoculado apresentava pH 7,0 que permaneceu inalterado após as inoculações de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* ou cultivo misto durante os tempos do experimentos 24h, 5 dias e 10 dias, mas aumentou para pH 8,0 na avaliação de 15 dias.

A fórmula infantil (**ANEXO 1**) não inoculada apresentou pH 7,0 e manteve-se constante no cultivo de *B. cereus* em todos os ensaios (24 horas, 5 dias, 10 dias e 15 dias); porém, quando inoculada com *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), após 24 horas o pH reduziu para 5,0 mantendo-se neste valor até o 15º dia. O mesmo comportamento observado para *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) isoladamente foi verificado no cultivo misto em fórmula infantil em todos os tempos. Este comportamento pode estar associado a lactose na fórmula infantil.

3.1.1. Formação de biofilmes mono-espécie

A formação de biofilmes mono-espécies de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* são apresentadas nas **Tabelas 1 e 2**.

As maiores contagens de células sésseis de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e de *B. cereus* nos cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 foram encontradas após 15 dias em fórmula infantil, com valores médios de 7,4 log UFC/cm² e 6,0 log UFC/cm², respectivamente (**Tabela 2**).

Observa-se que as contagens em log UFC/cm² de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em biofilmes mono-espécie diferiram significativamente (p<0,05) quando comparado seu desempenho nos dois meios de cultivo (LB e FI).

Para *B. cereus* apenas não houve diferença significativa nos tempos de 24 horas. Quando comparamos o desempenho dos dois microrganismos em um mesmo meio de cultivo, observamos que houve diferença significativa entre eles, com exceção do tempo 24 horas em fórmula infantil (**Tabelas 1 e 2**).

Tabela 1. Formação de biofilme mono-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em caldo Luria Bertani sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

microrganismo	Contagem (log UFC/cm ² * ± DP**)				
	0h	24h	5 dias	10 dias	15 dias
<i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.)	<1	5,9 ^a ±0,7	5,5 ^a ±0,1	5,7 ^a ±0,1	5,6 ^a ±0,1
<i>B. cereus</i>	<1	4,8 ^b ±0,2	4,5 ^b ±0,02	4,8 ^b ±0,1	4,7 ^b ±0,5

*Média de três repetições em triplicata

** Desvio padrão

Médias com letras em comum na mesma coluna não diferem entre si significativamente (p >0,05), segundo o teste de Tukey.

Tabela 2. Formação de biofilme mono-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em fórmula infantil sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4.

microrganismo	Contagem (log UFC/cm ² * ± DP**)				
	0h	24h	5 dias	10 dias	15 dias
<i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.)	<1	4,3 ^a ±0,7	7,1 ^a ±0,1	6,8 ^a ±0,1	7,4 ^a ±0,4
<i>B. cereus</i>	<1	4,8 ^a ±0,4	5,9 ^b ±0,5	5,8 ^b ±0,1	6,0 ^b ±0,6

*Média de três repetições em triplicata

** Desvio padrão

Médias com letras em comum na mesma coluna não diferem entre si significativamente (p >0,05), segundo o teste de Tukey.

A formação de biofilmes mono-espécies dos dois microrganismos em fórmula Infantil foi mais expressiva em relação ao caldo LB, devido provavelmente à maior oferta de nutrientes da fórmula infantil.

Os nossos resultados corroboram aos de outros pesquisadores que verificaram uma maior formação de biofilmes em fórmula infantil em relação a outros meios de cultivo. Oh, Cheng e Kang (2007) pesquisaram a influência do meio de cultivo na formação do biofilme de *E. sakazakii* e observaram uma maior formação de biofilme em fórmula infantil.

Beuchat et al. (2009) reportaram que, entre diferentes meios de cultivo, só houve a formação de biofilmes de *Cronobacter sakazakii* em aço inoxidável e tubos de alimentação enteral quando imersas em fórmula infantil a 25 °C.

Não foi encontrado até o momento, outro trabalho científico sobre a formação de biofilmes por *B. cereus* nas superfícies em contato com fórmula infantil.

3.1.2. Formação de biofilmes multi-espécies

Nas indústrias de alimentos devido à diversidade da produção, das matérias primas e dos produtos, pode ocorrer a formação de biofilmes com composição heterogênea e comportamento variado. O conhecimento do comportamento de diferentes microrganismos em um biofilme misto pode ajudar no desenvolvimento de medidas de controle e eliminação destes, nos ambientes de produção de alimentos.

Neste trabalho, observou-se que as contagens em log UFC/cm² de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em biofilmes multi-espécies diferiram significativamente ($p < 0,05$) quando comparado seu desempenho nos dois meios de cultivo. Para *B. cereus* não houve diferença significativa nos tempos de 10 e 15 dias. Quando comparamos o desempenho dos dois microrganismos em um mesmo meio de cultivo, observamos que houve diferença significativa entre eles, com exceção do tempo 15 dias em Luria Bertani (**Tabela 3**).

Há evidências de que bactérias Gram negativas tenham maior capacidade de adesão em superfícies inertes, devido, provavelmente, a eletronegatividade de suas membranas. Outra hipótese da maior capacidade de adesão de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em relação ao *B. cereus* seria a maior taxa de geração do primeiro, que permitiria um desenvolvimento mais rápido e manutenção de seu domínio (SPEERS; GILMOUR, 1985; BANKS; BYRES, 1991; POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

A contagem mais elevada de células sésseis de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em biofilmes multi-espécies (**Tabela 4**) foi de 7,2 log UFC/cm² em fórmula infantil após 15 dias, assim como no biofilme mono-espécie, onde nestas mesmas condições, a contagem foi de 7,4 log UFC/cm² (**Tabela 2**).

No cultivo misto (**Tabela 4**), a contagem mais elevada de *B. cereus* (4,9 log UFC/cm²) ocorreu com a fórmula infantil e incubação por 15 dias; já em cultivo mono-espécie (**Tabela 2**), para 15 dias de inoculação, a contagem foi maior, 6,0 log UFC/cm².

Como sugerido por McEldowney e Fletcher (1987), a existência de competição, reduz o número de cada espécie na adesão à superfície quando em cultivo misto. Segundo esses autores, duas outras situações também podem ocorrer quando bactérias aderem simultaneamente a uma superfície, (1) o aumento da adesão em relação à cultura pura e (2) nenhuma alteração da adesão. Estes fatos dependem dos microrganismos envolvidos; para cada caso pode haver uma situação diferente.

Pompermayer e Gaylarde (2000), também verificaram a melhor adesão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em culturas puras (mono-espécie) em relação à cultura mista e a superior capacidade de adesão pela *E. coli* (Gram negativa) sobre *S. aureus* (Gram positiva).

Tabela 3. Formação de biofilme multi-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em caldo Luria Bertani sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4.

Microrganismo	Contagem (log UFC/cm ² ± DP ^{**})				
	0h	24h	5 dias	10 dias	15 dias
<i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.)	<1	6,0 ±0,4 ^a	5,7 ±0,6 ^a	5,1 ±0,005 ^a	4,6 ±0,7 ^a
<i>B. cereus</i>	<1	3,0 ±0,1 ^b	1,9 ±0,4 ^b	3,3 ±0,1 ^b	4,4 ±0,7 ^a

*Média de três repetições em triplicata

** Desvio padrão

Médias com letras em comum na mesma coluna não diferem entre si significativamente (p >0,05), segundo o teste de Tukey.

Tabela 4. Formação de biofilme multi-espécie de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em fórmula infantil sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4.

Microrganismo	Contagem (log UFC/cm ² ± DP ^{**})				
	0h	24h	5 dias	10 dias	15 dias
<i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.)	<1	5,2 ±0,1 ^a	6,5 ±0,2 ^a	6,8 ±0,2 ^a	7,2 ±0,1 ^a
<i>B. cereus</i>	<1	3,6 ±0,1 ^b	3,5 ±0,3 ^b	3,0 ±0,4 ^b	4,9 ±0,8 ^b

*Média de três repetições em triplicata

** Desvio padrão

Médias com letras em comum na mesma coluna não diferem entre si significativamente (p >0,05), segundo o teste de Tukey.

3.2. Avaliação da formação dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

Fotomicrografias de aço inoxidável foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície para visualização de sua topografia ao longo do desenvolvimento de biofilmes.

A observação microscópica permitiu a visualização de pequenas irregularidades, ao longo da superfície do aço inoxidável AISI 304 #4 sem inoculação (**Figura 3**).

A rugosidade dos cupons utilizados neste trabalho foi de 0,366 μm , expressado pela média de nove repetições. Este resultado condiz com a rugosidade para o acabamento número 4 (#4), que pode variar de 0,15 a 0,40 μm , obtido a partir de lixamento úmido, com lixas abrasivas de grana que variam de 120 a 150 mesh (CARBÓ, 2006).

As imperfeições das superfícies, além de permitir a maior penetração de resíduos de alimentos, podem comprometer a eficiência da higienização, proporcionando assim substratos para os microrganismos presentes e subsequente adesão e formação de biofilmes (BOWER; MCGUIRE; DAESCHEL, 1996)

Nas **Figuras 4, 5 e 6** são apresentadas as fotomicrografias de superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidas ao processo de adesão e formação de biofilme por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) (**Figura 4 e 5**) e *B. cereus* (**Figura 6**) em caldo LB e FI a 25°C em diferentes tempos de contato. Nestas fotomicrografias, podemos observar as diferentes fases de formação dos biofilmes ao longo do tempo, com o aumento do número de células aderidas, formação de microcolônias, além da observação de matriz de exopolissacarídeo produzidas pelos microrganismos nas superfícies, como já reportado por Lehner et al. (2005) para *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.).

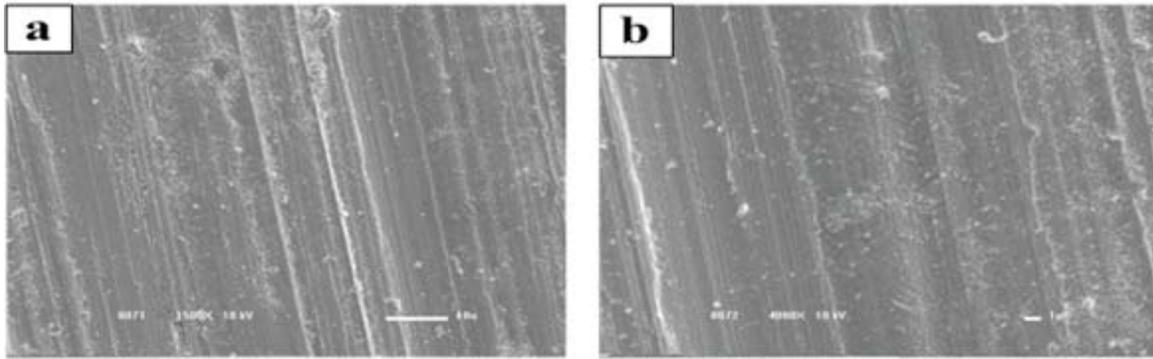


Figura 3. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, não submetidos ao processo de formação de biofilmes nos aumentos de 1500X (a) e 4000X (b).

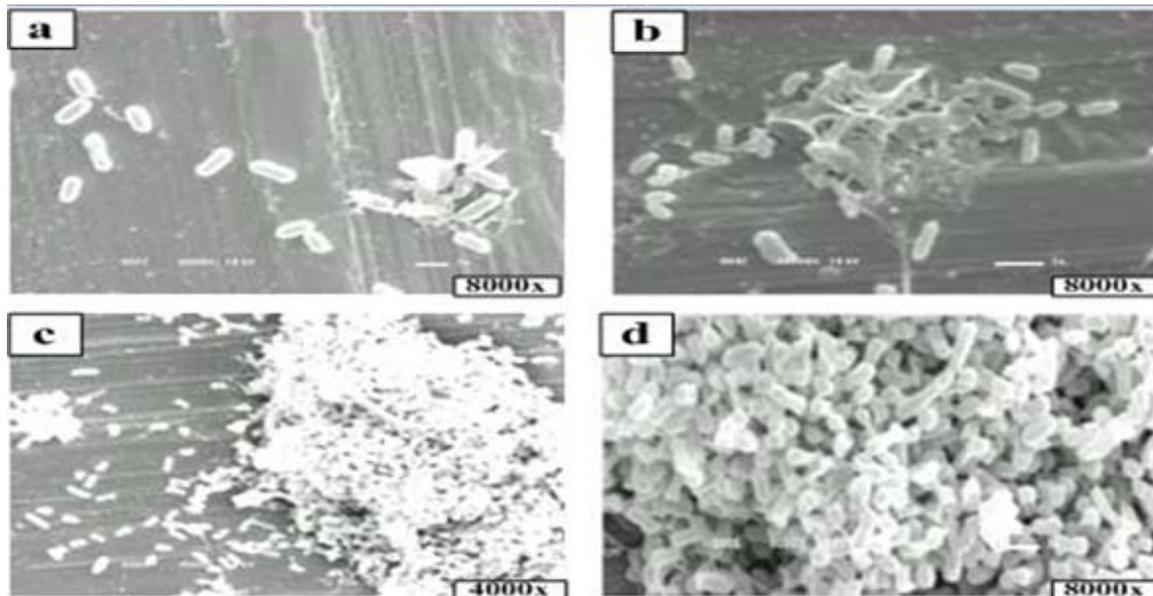


Figura 4. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilmes por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em caldo Luria Bertani a 25 °C por 24 horas (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e (d).

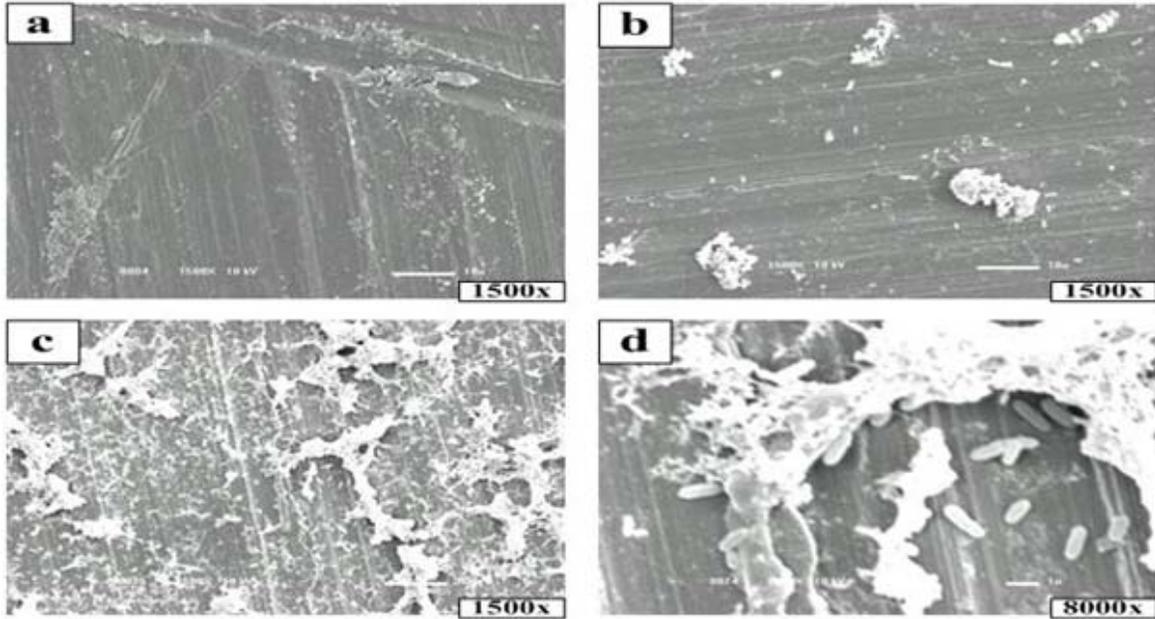


Figura 5. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em fórmula infantil a 25 °C por: 24 horas (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e (d).

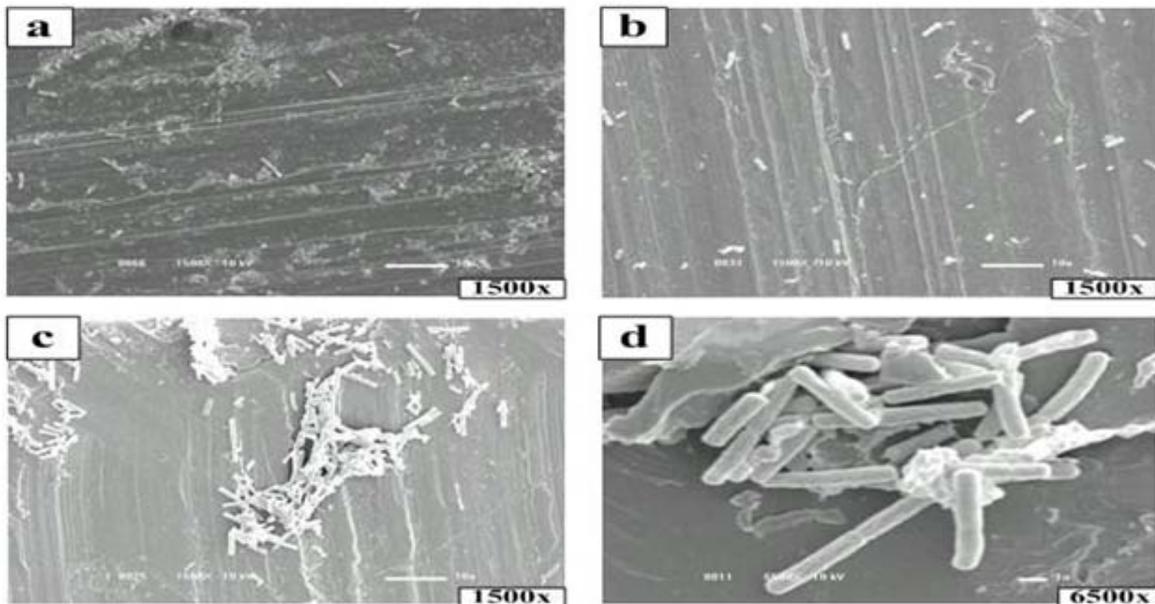


Figura 6. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilmes por *Bacillus cereus* em caldo Luria Bertani a 25 °C por 24 horas (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e (d).

3.3. Avaliação da eficiência de sanitizantes na remoção dos biofilmes

Os resultados da avaliação da ação dos sanitizantes ácido peracético 500 mg.L⁻¹ e hipoclorito de sódio 100 mg.L⁻¹ sobre as células sésseis de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* em biofilmes mono-espécie e multi-espécie formados nas superfícies de aço inoxidável são apresentados nas **Tabelas A.1, A.2, A.3, A.4, A.5, A.6, A.7 e A.8 (APÊNDICE)**.

As contagens iniciais de células sésseis de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* isoladamente e em cultivo multi-espécies em caldo LB foram reduzidas a níveis inferiores a 1 log UFC/cm² após sanitização com ácido peracético ([500mg/L]) ou hipoclorito de sódio ([100mg/L]).

No entanto, para os biofilmes produzidos em FI ocorreram diferentes situações com contagens de microrganismos em determinados tempos mesmo após o contato com as soluções de sanitizantes. Houve redução para níveis inferiores a 1 log UFC/cm² em todos os tempos avaliados apenas em biofilmes formados por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em biofilmes mono-espécie e multi-espécie após contato com ácido peracético e biofilmes de *B. cereus* em cultivo misto após contato com hipoclorito de sódio. Nas demais condições avaliadas, observou-se maior resistências aos sanitizantes, principalmente no 15° dia de incubação.

Em particular, na **Tabela A.8**, observa-se que a exposição ao ácido peracético proporcionou a redução na contagem de *B. cereus* de apenas 2,0 log UFC/cm², em biofilme de 15 dias.

A característica particular de cada meio de cultivo pode influenciar no desenvolvimento dos biofilmes e na resistência destes aos sanitizantes. No caso da fórmula infantil, possivelmente a sua rica composição em matéria orgânica forneceria maior proteção ao biofilme frente à atividade de alguns sanitizantes (MARRIOTT; GRAVANI, 2006; TROLLER, 1993). Este fato é preocupante, pois a fórmula infantil é importante veículo destes microrganismos em estudo.

Outro fator importante na resistência das células aos sanitizantes é a habilidade de alguns microrganismos produzirem substâncias poliméricas extracelulares, grande responsável por conferir proteção aos sanitizantes, pois agem como barreira física impedindo que sanitizantes cheguem a seus sítios de ação. Algumas fotomicrografias obtidas neste trabalho (**Figuras 4, 5 e 6**) evidenciam a produção destas substâncias pelos microrganismos. Lehner et al. (2005) relataram que isolados de *Enterobacter sakazakii* produziram uma massa viscosa e leitosa, considerada como polissacarídeo extracelular, esta massa foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, revelando a presença de glicose, galactose, frutose e ácido glucurônico.

Composição semelhante foi descrita por Harris e Oriel (1989) em patente relacionada ao heteropolissacarídeo produzido por *E. sakazakii*.

4. Conclusão

Este trabalho evidenciou a capacidade dos microrganismos *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* em formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável AISI 304 #4, utilizando cultivos em fórmula infantil e caldo Luria Bertani. A composição dos meios de cultivo, ou produtos alimentícios, influi na formação dos biofilmes bacterianos sobre a superfície de aço inoxidável e na resistência destes aos processos de sanitização por soluções de ácido peracético ou hipoclorito de sódio. Além disso, formações de biofilmes mais maduros proporcionam maior resistência à ação de sanitizantes.

Estes resultados reforçam a importância da prevenção da contaminação das superfícies que entram em contato com o produto durante a produção e/ou reconstituição da fórmula infantil, evitando o desenvolvimento da adesão bacteriana e formação de biofilmes por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* em superfícies de aço inoxidável.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**. v.28, p.145-155, 1995.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 16th ed., Washington: American Public Health Association, p. 305, 1985.

BANKS, M.K.; BRYERS, J. D. Bacterial specie within a binary culture biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1974-1979, 1991.

BAR-OZ, B., PREMINGER, A., PELEG, O., BLOCK, C., Arad, I. Clinical observation *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. **Acta Paediatrica**, v. 90, p. 336–358, 2001.

BECKER, H; SCHALLE, G; VON WIESE, W; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 23, n. 1, p. 1-15, 1994.

BEUCHAT, L. R., KIM, H., GURTLER, J. B., LIN, L. C., RYU, J. H., RICHARDS, G. M. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. **International Journal of Food Microbiology**, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029; 2009.

BIERING, G., S. KARLSSON, N. C. CLARK, K. E. JONSDOTTIR, P. LUDVIGSSON, AND O. STEINGRIMSSON. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 27, p.2054–2056, 1989.

BOWER, C. K. M; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A., The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1996.

CARBÓ, H. M. **Aço inox – Especificações técnicas**. ACESITA S. A., 2006.
Disponível em: www.acesita.com.br, acessado em: 10/09/2008.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SOCOTT, H. M. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**. v. 49, p. 711-745, 1995.

FAO/WHO FOOD STANDARD. Codex alimentarius Official Standards. Official Codex Standard. List CAC/RCP 66- 2008. **CODE OF HYGIENIC PRACTICE FOR POWDERED FORMULAE FOR INFANTS AND YOUNG CHILDREN**.

Disponível em:

www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/CXP_066e.pdf Acesso em : dezembro 2009.

GURTLER, J. B.; KORNACKI, J. L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p.1-34, 2005.

HARRIS, L. S.; ORIEL, P. J, 21 February 1989. Heteropolysaccharide produced in *Enterobacter sakazakii*. U. S. patent 4,806,636, 1989.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v.6, n. 1, 1995.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**. v. 14, n.11, p. 443-454, 2003.

IVERSEN, C., MULLANE, M., MCCARDELL, B., TALL, B.D., LEHNER, A., FANNING, S., STEPHAN, R. and JOOSTEN, H. *Cronobacter Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis*, sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies 1*, and of three subspecies. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *Lactaridi* subsp. nov. **International Journal System Environmental Microbiology**, v.58, p. 1442–1447, 2008.

JOHNSON DIVERSEY. **Divosan Forte – Método de análise da solução de uso.** 2p, 2002.

KIM, H; RYU, J-H; BEUCHAT, L. R. Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, Dried on the Surface of Stainless Steel, and in a Biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1256-1265, 2007.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**. v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005.

MARRIOTT, N. G.; GRAVANI, R. B. **Principles of food sanitation**, 5th ed. Springer, New York, NY, 2006.

McELDOWNEY, S.; FLETCHER, M. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. **Archives of Microbiology**. v. 148, p.57-62., 1987.

MULLANE, N., HEALY, B., MEADE, J., WHYTE, P., WALL, P. G. AND FANNING, S. Dissemination of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk production manufacturing facility. **Applied Environmental Microbiology**. v. 74, p.5913–5917, 2008.

OH, S. W., CHEN, P. C., KANG, D.-H. Biofilm Formation by *Enterobacter sakazakii* grown in artificial broth and infant milk formula on plastic surface. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, n. 15, p. 311–319, 2007.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A.M. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.

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 Microbiology**, 17, p. 361-365, 2000.

SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Revista Microbiologia in foco** – Sociedade Brasileira de Microbiologia, n.2, p.4-12, 2007.

SPEERS, J. G. S; GILMOUR, A. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 325 – 332, 1985.

TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, 1993.

VAN ACKER, J., DE SMET, F., MUYLDERMANS, G., BOUGATEF, A., NAESSENS, A. AND LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p. 293–297, 2001.

WONG, A. C. L. Biofilms in Food Processin Environments. **Journal Dairy Science**. v. 81, n.10, p. 2765-2770, 1998.

ANEXO 1

Composição da fórmula infantil comercial (marca A) utilizada no presente trabalho.

Componentes	Por 100 g de pó	Por 100 mL de fórmula reconstituída
Carboidrato g	58	7,5
Proteína g	9,5	1,2
Gorduras totais g	28	3,6
Gorduras saturadas g	11	1,4
Gorduras trans g	0	0
Ac.linoléicog	4,1	0,5
Fibra alimentar g	0	0
Ac α.linoléico mg	520	67
Sódio mg	120	15
Cálcio mg	320	41
Ferro mg	6,2	0,8
Potássio mg	460	59
Cloreto mg	330	43
Fósforo mg	160	21
Magnésio mg	36	4,6
Iodo µg	78	10
Cobre µg	310	40
Zinco mg	3,9	0,50
Selenio µg	10	1,3
Manganês mg	0,06	0,01
Vit. A µgRE	540	70
Vit. D µg	7,8	1,0
Vit. E mg TE	4,2	0,54
Vit. K µg	42	5,4
Vit. C mg	52	6,7
Vit. B1 mg	0,34	0,04
Vit. B2 mg	1,1	0,14
Niacina mg	5,2	0,67
Vit. B6 mg	0,57	0,07
Ac. Fólico µg	62	8,0
Ac. Pantotênico mg	1,7	0,22
Vit. B12 µg	1,6	0,21
Biotina µg	11	1,4
Colina mg	58	7,5
Inositol mg	26	5,4
Taurina mg	42	5,4
L-Carnitina	8,3	1,1

Fonte: Fabricante - rótulo produto.

APÊNDICE

Tabela A.1. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados sobre cupons de aço inoxidável Al304 #4 em caldo Luria Bertani.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	6,5	<1	<1
5 dias	5,4	<1	<1
15 dias	5,7	<1	<1

Tabela A.2. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados sobre cupons de aço inoxidável Al304 #4 em caldo Luria Bertani.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	4,7	<1	<1
5 dias	4,5	<1	<1
15 dias	4,7	<1	<1

Tabela A.3. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados sobre cupons de aço inoxidável Al304 #4 em fórmula infantil.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	4,8	<1	<1
5 dias	6,3	<1	<1
15 dias	6,7	<1	4,3

Tabela A.4. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados sobre cupons de aço inoxidável Al304 #4 em fórmula infantil.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	4,3	<1	<1
5 dias	5,0	2,7	<1
15 dias	5,8	1,7	2,2

Tabela A.5. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados em cultivo misto com *Bacillus cereus*, sobre cupons de aço inoxidável Al304 #4 em caldo Luria Bertani.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	6,2	<1	<1
5 dias	5,2	<1	<1
15 dias	5,0	<1	<1

Tabela A.6. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados em cultivo misto com *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), sobre cupons de aço inoxidável Al304 #4 em caldo Luria Bertani.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	3,2	<1	<1
5 dias	1,6	<1	<1
15 dias	4,2	<1	<1

Tabela A.7. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) formados em cultivo misto com *Bacillus cereus*, sobre cupons de aço inoxidável A1304 #4 em fórmula infantil.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	5,6	<1	<1
5 dias	6,2	<1	<1
15 dias	7,5	<1	2,9

Tabela A.8. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *Bacillus cereus* formados em cultivo misto com *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), sobre cupons de aço inoxidável A1304 #4 em fórmula infantil.

Tempo	contagem inicial (log UFC/cm ²)	contagem final (log UFC/cm ²)	
		ácido peracético (500mg.L ⁻¹)	hipoclorito de sódio (100 mg.L ⁻¹)
24 horas	3,1	<1	<1
5 dias	4,0	1,7	<1
15 dias	4,7	2,7	<1

CAPÍTULO III - *Quorum sensing* e *Quorum quenching* em *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*

Resumo

Quorum sensing é um mecanismo de sinalização célula-célula que pode modular algumas funções celulares, incluindo produção de bacteriocinas, fatores de virulência e formação de biofilme. A regulação desse sistema é mediada pelo acúmulo de uma classe ou mais de moléculas sinalizadoras produzidas pela célula e excretadas para o meio externo. A quebra desse sistema de comunicação é denominada sistema *quorum quenching*. Neste trabalho, pesquisou-se a ocorrência dos sistemas *quorum sensing* e *quorum quenching* em duas bactérias patogênicas de grande interesse na indústria de alimentos, *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* e a possível influência das moléculas sinalizadoras na sensibilidade destas bactérias à antimicrobianos. Os testes de atividades biológicas das culturas, dos extratos e das frações destes, realizados com biossensores revelaram-se positivos para a produção de acil homoserinas lactonas (acil-HSL) pela cepa de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), enquanto que, para *B. cereus* os resultados foram negativos. Nos ensaios com cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* observou-se a redução e/ou a não detecção das homoserinas lactonas produzidas por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), resultado este provavelmente associado ao fenômeno *quorum quenching*. A pesquisa revelou ainda a provável presença de moléculas sinalizadoras AI-2 e AI-3 e foi confirmada a presença de moléculas sinalizadoras AI-1, cuja caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) revelou a capacidade da cepa de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em produzir os compostos *N*-heptanoil-HSL, *N*-dodecanoil-HSL e *N*-tetradecanoil-HSL, ainda não reportados na literatura.

Palavras chaves: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Bacillus cereus*, acil homoserina lactona, *quorum sensing*, *quorum quenching*.

Summary

Cell to cell communication or quorum sensing is a signaling mechanism that can modulate some cell functions, including sporulation, bacteriocin production, virulence factors and biofilm formation. Regulation of this system is mediated by the accumulation of one or more classes of signaling molecules produced by the cell and excreted into the external medium. Disruption of this communication system, known as quorum quenching, occurs due to the degradation of the signaling molecules. The objective of the present study was to research the occurrence of quorum sensing and quorum quenching systems in two pathogenic bacteria of great interest to the food industry, *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *B. cereus*, as well as verifying the possible influence of signaling molecules in the sensibility of the bacteria under study to anti-microbials. The tests for the biological activities of the cultures and of the extracts and fractions obtained from them were carried out using biosensors, and were shown to be positive for the production of homoserine lactones by the strain of *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), whereas the results were negative for the strain of *B. cereus*. An interesting fact was observed in the mixed cultivation of *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and *B. cereus*, where a reduction and/or non-detection of the homoserine lactones produced by the *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) was observed, a result which could be associated with the phenomenon of quorum quenching. The study also showed the possible presence of the signaling molecules AI-2 and AI-3 and confirmed the presence of AI-1 signaling molecules which chemical characterization by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) showed the ability of the strain of *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to produce three compounds, *N*-heptanoyl-HSL, *N*-dodecanoyl-HSL and *N*-tetradecanoyl-HSL, a fact not previously reported in the literature.

Keywords: *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Bacillus cereus*, acyl homoserine lactone, quorum sensing, quorum quenching.

1. INTRODUÇÃO

Quorum sensing é um mecanismo de sinalização célula-célula que pode modular algumas funções celulares, incluindo a produção de bacteriocina, fatores de virulência e formação de biofilme. A regulação desse sistema é mediada pelo acúmulo de uma ou mais classes de moléculas sinalizadoras, denominadas autoindutores (AI), produzidas pela célula bacteriana e excretadas para o meio externo. Quando se atinge uma concentração crítica elas são detectadas pelas bactérias que respondem a este sinal, alterando a expressão de determinados genes (WATERS; BASSLER, 2005; READING; SPERANDIO, 2006).

Alguns sistemas de *quorum sensing* utilizados por bactérias já foram descritos: (1) sistema tipo LuxR/I, sendo este utilizado por bactérias Gram-negativas, na qual as moléculas sinalizadoras são as acil homoserinas lactonas-acil-HSL (AI-1); (2) a sinalização por peptídeos, utilizada por bactérias Gram-positivas; (3) a sinalização tipo LuxS/AI₂, utilizada tanto por bactérias Gram-positivas quanto Gram negativas, para comunicação interespecie; e (4) sistema de comunicação AI-3/epinefrina/não-epinefrina (READING; SPERANDIO, 2006).

Existem diversas formas de se estudar o sistema *quorum sensing* e uma delas envolve a avaliação da presença das acil-HSLs (AI-1), por exemplo, utilizando como biossensores bactérias sensíveis a presença destas moléculas sinalizadoras (STEINDLER; VENTUR, 2007).

Dentre as bactérias utilizadas como biossensores cita-se a *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), mutante incapaz de produzir acil-HSLs, no entanto, pode detectar a presença destes metabólitos presentes em cultivos, extratos e produtos sintéticos, uma vez que o sistema de detecção foi inserido pelo plasmídeo pZLR4, que contém o gene *traR* e uma fusão *traG::lacZ*. Assim, acil-HSLs exógenas ligam-se a proteína receptora TraR e o complexo formado regula a expressão do gene *lacZ*, responsável pela síntese de uma enzima β -galactosidase, capaz de degradar o reagente 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal), gerando um derivado de índigo de coloração azul (POMINI et al., 2005).

Outro biossensor utilizado é o *Chromobacterium violaceum* CV026, mutante deficiente na produção de acil-HSLs e violaceína, um pigmento cuja produção é regulada por *quorum sensing*. A presença de acil-HSL exógena ativa a produção de violaceína tornando o meio roxo (STEINDLER; VENTUR, 2007).

A pesquisa de genes relacionados ao sistema *quorum sensing* e a confirmação por testes de auto-indução utilizando bactérias biossensoras, também são utilizados, como por exemplo na identificação das moléculas sinalizadoras AI-2. Neste caso pesquisa-se o gene *luxS*, necessário para produção de AI-2, e confirma-se com ensaio utilizando-se o mutante *Vibrio harveyi* BB170.

A ocorrência do sistema *quorum sensing* em bactérias deterioradoras e patogênicas diretamente nos alimentos tem sido demonstrada em diversas pesquisas (SMITH, FRATAMICO, NOVAC; 2004; CHRISTENSEN et al., 2003; FLOGAARD et al., 2003 ; GRAM et al., 2002, GRAM et al., 1999).

A quebra desse sistema de comunicação é denominada sistema *quorum quenching*. Portanto, considerando os inúmeros processos regulados por *quorum sensing*, a inativação desta comunicação seria de grande interesse na área médica, alimentar e ambiental (ULRICH, 2004; MARTINEZ et al., 2007).

Neste trabalho, duas bactérias de grande importância na indústria de alimentos - *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*, principalmente do setor de produtos lácteos, foram objetos de estudo.

Enterobacter sakazakii é uma bactéria patogênica pertencente à família *Enterobacteriaceae*, Gram negativa, não formadora de esporos, formadora de cápsulas de material polissacarídeo, que tem sido associada a diversos surtos e casos de meningites principalmente em neonatos (IVERSEN; FORSYTHE, 2003; GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005). A sua classificação taxonômica foi alterada com a criação do gênero *Cronobacter* (IVERSEN et al. 2008). O Codex Alimentarius adotou a nomenclatura *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) em seus textos, em substituição a denominação *Enterobacter sakazakii* (FAO/WHO, 2008). No presente trabalho, esta denominação também foi adotada.

E. sakazakii (*Cronobacter* spp.) têm sido isoladas de inúmeras fontes alimentares, ambientais e clínicas, porém fórmula infantil tem sido o principal veículo de transmissão (IVERSEN; FORSYTHE, 2003).

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva, amplamente distribuída na natureza, móvel e pode causar dois tipos de doenças de origem alimentar, a síndrome emética e diarréica. Esta bactéria sobrevive a várias condições ambientais, devido à sua condição de formar endosporos resistentes ao calor, desidratação e outros agentes físicos sendo por esta razão um grande problema na indústria de alimentos (BENNETT; BELAY, 2001; SCHOENI; WONG, 2005).

O objetivo deste trabalho, devido à importância para a segurança dos alimentos, foi avaliar a possível ocorrência dos sistemas *quorum sensing* e *quorum quenching* em bactérias patogênicas - *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas

- *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), isolada de mamadeira de berçário da região da Grande SP, ribotipo DUP 18623, cedido pelo Laboratório de Microbiologia – FCF/USP- São Paulo.
- *Bacillus cereus* ATCC 14597 cepa da coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação- FEA-UNICAMP.
- *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZL R4) cepa mutante biossensora de HSL (POMINI et al., 2005) Cepa mantida e repicada em todos os experimentos em caldo Luria Bertani suplementado com gentamicina (50 µg/mL)
- *Chromobacterium violaceum* CV026 cepa mutante de *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, biossensora de HSL (McCLEAN et al.,1997).

Cepa mantida e repicada em todos os experimentos em caldo Luria Bertani suplementado com kanamicina (50 µg/mL)

- TEVS232- cepa mutante contendo fusão *LEE1:lacZ* utilizada nos ensaios de β-galactosidase (SPERANDIO et al., 1999).

2.2. Pesquisa do auto indutor AI-1, acil homoserinas lactonas (acil-HSL) em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus*

2.2.1. Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) e *Chromobacterium violaceum* CV026 utilizando cultivos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* e cultivo misto

Os testes realizados com *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) foram adaptados de Pomini et al. (2005).

Inóculos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* e cultura mista destes dois microrganismos foram preparados em tubos de ensaio contendo 2 mL de caldo Luria Bertani (LB), os quais, posteriormente, foram incubados a 35°C por 24 horas. Após esse período realizaram-se os seguintes experimentos em tubos de ensaio contendo 2 mL de caldo LB:

- tubo 1 (controle negativo): 20 µL *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), 20 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal) (50 mg/mL em dimetilformamida, DMF);
- tubo 2 (controle positivo): 20 µL *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), 20 µL de X-Gal, 20µL de C12-HSL sintética 2 mg mL⁻¹ (sintetizada pelo laboratório de Química Orgânica, Instituto de Química, UNICAMP);
- tubo 3 (*E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.): 20 µL *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4); 20 µL de X-Gal e 20 µL *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.);
- tubo 4 (*B. cereus*): 20 µL *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), 20 µL de X-Gal e 20 µL *B. cereus* ATCC 14597;
- tubo 5 (cultivo misto): 20 µL *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), 20 µL de X-Gal e 20 µL *B. cereus* ATCC 14597 e *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.)

Em seguida, os tubos foram mantidos sob incubação a 30°C, e após 24 horas avaliaram-se visualmente as mudanças de coloração.

A cepa monitora *C. violaceum* CV026 foi cultivada em caldo LB acrescido de kanamicina (50 µg/mL) a 25 °C por 24 horas. Em tubos contendo 2 mL de caldo LB e 20 µL da cepa *C. violaceum* CV026 foram adicionados 20 µL dos microrganismos *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus*, cultivo misto bem como seus extratos. Os tubos foram incubados a 25 °C por 24 horas. Como controle positivo foi utilizado o composto C7-HSL (2 mg/mL), previamente sintetizado pelo laboratório de Química Orgânica, Instituto de Química, UNICAMP. O desenvolvimento da coloração violeta indicou resultado positivo para presença de acil-HSLs.

Os mesmos experimentos descritos acima, também foram realizados substituindo-se o meio LB pelo mesmo volume (2 mL) de fórmula infantil (FI) para lactentes de 0 a 6 meses adquirida no comércio (marca A/ **ANEXO 1**), reconstituída segundo instruções do fabricante e esterilizada a 121°C por 15 minutos (OH; CHEN; KANG, 2007). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A fórmula infantil foi utilizada apenas neste teste.

2.2.2. Bioensaio com extratos de cultivos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* e cultivo misto com *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) e *Chromobacterium violaceum* CV026

Os testes foram adaptados de Pomini, Meirelles e Marsaioli (2007). *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* ATCC 14597 foram inoculados em tubos contendo 10 mL de caldo LB e mantidos em incubação a 35°C por 24 horas. Em seguida, os cultivos - (1) *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), (2) *B. cereus* e (3) os dois microrganismos em cultivo misto - foram transferidos, separadamente, para erlenmeyers (2 L) contendo 1L de caldo LB e incubados sob agitação de 100 rpm, a 35°C/24h. Realizou-se a centrifugação dos meios a 3.900xg por 20 minutos a 5°C. Efetuou-se a extração do sobrenadante com acetato de etila previamente destilado (3 x 500 mL), a secagem com sulfato de

magnésio anidro, a filtração com algodão tratado e a evaporação do solvente sob pressão reduzida. O controle (branco) foi obtido a partir de 1L de caldo LB estéril e extraído com acetato de etila conforme descrito acima. Os extratos obtidos dos cultivos dos microrganismos e do cultivo misto foram solubilizados em etanol na concentração de 2 mg/mL e então utilizados nos testes com a cepa *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) para avaliar a expressão da enzima β -galactosidase, e *Chromobacterium violaceum* CV026, conforme descrito no item 2.2.1.

2.2.3. Detecção de acil-homoserina lactonas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Os experimentos realizados foram adaptados de Pomini et al. (2005) e Pomini, Meirelles e Marsaioli (2007). A partir dos ensaios com resultados positivos da presença de acil-HSLs, nos itens 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3, partiu-se para a detecção das acil-HSL por CG-EM. O procedimento de cultivo e extração com acetato de etila, apresentado no item 2.2.2, foi repetido oito vezes, obtendo-se 700,2 mg de extratos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e 713,2 mg do extrato de cultivo misto.

Esses extratos foram purificados por cromatografia *flash* em coluna de sílica gel (coluna com 2 cm de diâmetro; 15 g de sílica 0,035-0,070 mm de granulometria), utilizando hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 81 frações do extrato de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e 56 do extrato do cultivo misto. O fracionamento foi bioguiado, realizando-se o bioensaio com *A. tumefaciens* e *C. violaceum* CV026, além do acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD). As análises por CCD foram feitas em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) suportadas sobre alumínio, utilizando-se revelação química com a solução de p-anisalaldeído (5%), e subsequente aquecimento das placas até aparecimento de manchas coloridas.

As frações que apresentaram diferentes tempos de retenção (RFs) na CCD foram analisadas por CG-EM. As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo a gás Agilent 6890, acoplado a um detector de massas Hewlett-

Packard 5973 operando por impacto de elétrons a 70 eV. O cromatógrafo operou com coluna capilar de sílica fundida (HP5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), usando hélio como gás de arraste (1 mL/min), com injetor a 250 °C e interface a 280 °C. As amostras foram injetadas no modo *split* (1 µL) em acetato de etila (1 mg/mL). Utilizou-se temperatura programada iniciando com 100°C e incremento de 10°C/min até 290°C, mantendo-se nesta temperatura por 10 min. Foi realizada detecção por varredura de íons com intervalo de massas entre *m/z* 40-450. Foram monitorados nos espectros de massas os sinais com padrões de fragmentação característicos das acil-HSLs, como *m/z* 143, 128, 102, 101, 100 e 85.

Para verificar se os metabólitos identificados eram provenientes do metabolismo bacteriano e não do próprio meio de cultivo, foi realizada análise do meio de cultivo LB empregando-se a mesma metodologia descrita acima com varredura dos íons característicos das acil-HSLs.

2.2.4. Confirmação das estruturas das acil-homoserinas lactonas

Os produtos (±)-*N*-heptanoil-HSL, (S)-*N*-heptanoil-HSL, (±)-*N*-dodecanoil-HSL, (S)-*N*-dodecanoil-HSL, (±)-*N*-tetradecanoil-HSL e (S)-*N*-tetradecanoil-HSL foram sintetizados pelo laboratório de Química Orgânica, Instituto de Química, UNICAMP. Todos os produtos sintéticos foram caracterizados por CG-EM e RMN de ¹H e ¹³C.

Esses produtos sintéticos foram utilizados para confirmação das estruturas das acil-HSL encontradas nas frações (item 2.2.4), através de co-injeção e comparação dos espectros de massas obtidos por CG-EM, utilizando as condições cromatográficas descritos no item 2.2.4.

2.2.5. Degradação de acil homoserinas sintéticas por *Bacillus cereus*

A cepa monitora *C. violaceum* CV026 foi cultivada em caldo LB acrescido de kanamicina (50 µg/mL) a 25 °C por 24 horas. A cepa monitora *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) foi cultivada em caldo LB acrescido de gentamicina (50 µg/mL) a

30 °C por 24 horas. As acil-HSLs foram sintetizadas pelo laboratório de Química Orgânica, Instituto de Química, UNICAMP.

B. cereus ATCC 14597 foi cultivado em 2 mL de caldo LB a 30°C por 24 horas. A este crescimento, adicionou-se:

- tubo 1: 20 µL de *C. violaceum* CV026 e 20µL de C7-HSL sintética 2 mg/mL. Incubação a 25 °C por 24 horas.
- tubo 2: 20 µL de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e 20µL de C12-HSL sintética 2 mg/mL. Incubação a 30 °C por 24 horas.

Como controle positivo: (1) caldo LB acrescido de 20 µL de *C. violaceum* CV026 e 20µL de C7-HSL sintética 2 mg/ mL, incubação a 25 °C por 24 horas. (2) caldo LB acrescido de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e 20µL de C12-HSL sintética 2 mg/mL , incubação a 30 °C por 24 horas.

Como controle negativo: (1) caldo LB acrescido de 20 µL de *C. violaceum* CV026 e 20 µL de *B. cereus* com crescimento de 24 horas, incubação a 25 °C por 24 horas. (2) caldo LB acrescido de 20 µL de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e 20 µL de *B. cereus* com crescimento de 24 horas, incubação a 30 °C por 24 horas.

2.3. Avaliação da possível presença dos autoindutores AI-2 e AI-3

2.3.1. Detecção do gene *luxS*

Para a avaliar a presença do gene *luxS* em culturas de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* foram realizados ensaios com a técnica de PCR:

▶ K1663 : 5'-GTCGACGCCGCTGATACCGAACCG-3' (SPERANDIO et al.2001)

▶ K1664:5'-GTCGACGCGGTGCGCACTAAGTACAA-3'(SPERANDIOet al.2001)

▶ 5'-CCCTTTCACAGGCAGTTTTTC-3' (neste estudo).

▶ 5'-GATCATACGATTGTAAAGGCACC-3' (neste estudo) Os primers foram confeccionados baseados na sequencia descrita para cepa *B. cereus* ATCC 14579 depositados no genbank número de acesso NC_004722.

2.3.1.1. Extração do DNA

Uma alçada da cultura proveniente do ágar Brain Heart Infusion (BHI) foi inoculado em 10 ml de caldo BHI e incubado a 32 °C durante 18 horas sob

agitação a 200 rpm. Uma alíquota de 250 ul deste caldo foi transferida para um tubo Eppendorf® e centrifugada a 13000xg/10min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet depositado no fundo do tubo foram adicionados 100 ul de tampão TE (Tris,EDTA) pH 7, 5 (Invitrogen®). As células bacterianas foram então lisadas através da incubação a 100°C por 10 minutos e o DNA foi separado por centrifugação a 13.000xg por 3 minutos. O sobrenadante com o DNA bacteriano foi estocado a -20°C.

2.3.1.2. Reação em cadeia da Polimerase (SIRCILI, 2004)

A amplificação do DNA de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* ATCC 14597 foi realizada em termociclador Mastercycler epgradients 534 (Eppendorf) utilizando-se um ciclo inicial a 94°C/9min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30s, anelamento a 60°C por 1min e extensão a 72°C por 1min e 30s e ciclo final a 72°C/7min. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de 50 ul contendo 2U *Taq*-polimerase; tampão (Tris-HCl, ph 8,2 – 20 mM/50 mM KCl); 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM ul de dNTPs; 0,5 µM primers, 1 µl do DNA extraído e água Mili-Q esterilizada. Como controle positivo para amplificação do gene *luxS* utilizou-se a cepa EDL 933, de *E.coli* sorotipo O157:H7 Protótipo de EHEC e como controle negativo a cepa *E. coli* DH5α, cepa conhecidamente não produtora de AI-2. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em solução tampão de Tris-borato EDTA (TBE), corados com solução de Syber Safe® visualização do produto da PCR pela transiluminação UV. Marcador de peso molecular foi utilizado em cada gel (1 Kb DNA ladder; Invitrogen). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

2.3.2. Avaliação da atividade de β-galactosidase (SIRCILI, 2004)

As amostras bacterianas de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* foram incubadas a 37°C com agitação de 250 rpm em caldo LB 0.4M NaCl até atingir DO₆₀₀ de 1.0. O crescimento foi centrifugado a 9800xg por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtros de celulose com poro de 0.22µm (Milipore Co., EUA). Ao produto obtido denominou-se meio pré-condicionado.

A amostra TEVS232 contendo a fusão *LEE1::lacZ* foi inoculada nos meios pré condicionados de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus*, incubada a 37°C com agitação de 250 rpm até atingir uma $DO_{600} > 0,2$. Após atingir $DO_{600} > 0,2$, as amostras foram mantidas em gelo por aproximadamente 20 minutos. Foi realizada a transferência de 100 µl do crescimento para um tubo contendo 900 µl de tampão Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0,06M/ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,04M/ KCl 0,01M/ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001M/ β-mercaptoetanol 0,05M, pH 7,0). Para a ruptura das células foi adicionada uma gota de SDS 10% e duas gotas de clorofórmio. Após a homogeneização e a ruptura celular (aproximadamente 5 minutos) foram adicionados 200 µl de uma solução de orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) (4mg/mL), em tampão fosfato 0,1M e feita incubação a temperatura ambiente. A reação foi monitorada até o desenvolvimento de coloração amarela (aproximadamente 15 minutos) e então foi interrompida com a adição de 500 µl de solução de Na_2CO_3 1M. Foi realizada então a transferência da solução para tubos de polipropileno e a centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e leitura da DO_{420} . A atividade de β galactosidase foi medida da seguinte maneira:

$$Miller\ units\ (Unidade\ de\ Miller) = \frac{1000 * DO_{420}}{t * v * DO_{600}}$$

onde t = tempo da reação, v = volume inicial da cultura (100 µl). Como controle positivo foi utilizada a cepa E2348 prototipo de EPEC típica sorotipo 126 H7 e controle negativo o meio de cultura LB. Os meios pré-condicionados foram submetidos, previamente, ao teste com ONPG para verificar a ausência de β-galactosidase, cuja presença resultaria em resultado falso positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3.3. Efeito de acil-homoserinas lactonas sobre *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* submetidos ao teste de sensibilidade à antimicrobianos

As cepas de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* foram cultivadas em caldo LB a 35°C por 24 horas, com e sem a adição de acil-HSL e foram

avaliadas quanto a sensibilidade à antimicrobianos pelo método de disco-difusão padronizado.

Em todos os ensaios foram utilizadas duas concentrações (10 µmol/L e 50 µmol/L) dos compostos sintéticos C7-HSL, C12-HSL e C14-HSL (**item 2.2.5**).

A execução deste teste seguiu os procedimentos preconizados nos critérios do “Clinical and Laboratory Standards Institute” CLSI (CLSI, 2003).

As placas com ágar Muller Hinton foram incubadas a 35°C/18-24h e os diâmetros da zona de inibição foram medidos. As culturas foram classificadas em resistente, sensível ou intermediária.

Os antibióticos utilizados foram selecionados como os de uso para cepas Gram-positivas e Gram-negativas, assim como alguns aprovados para o tratamento de infecções bacterianas em animais e que poderiam estar presentes em alimentos derivados destes: Amicacina (AMI 30µg), Amoxicilina+Ac.clavulônico (AMC 10µg), Ampicilina (AMP 10µg), Aztreonam (ATM 30µg), Cefalotina (CFL 30µg), Cefepime (COM 30µg), Cefotaxima (CTX 30µg), Cefoxitina (CFO 30µg), Ceftazidima (CAZ 30µg), Ceftriaxona (CRO 30µg), Ciprofloxacina (CIP 5µg), Cloranfenicol (CLO 30µg), Eritromicina (ERI 15µg), Gentamicina (GEN 10µg), Imipenem (IMP 10µg), Neomicina (NEO 30µg), Norfloxacina (NOR 10µg), Tetraciclina (TET 30µg), Tombramicina (TOB 10µg) e Vancomicina (VAN 30µg). Os discos de antibióticos utilizados foram da marca Sensifar-CEFAR®. Conforme especificado na metodologia, como controle do teste utilizamos a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A leitura dos resultados - medida dos halos de inibição- foi realizada após 12-18 horas de incubação.

Os resultados obtidos foram analisados comparando os experimentos com e sem as diferentes concentrações de aci-HSLs. Foram realizados três repetições independentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Pesquisa do auto-indutor AI-1, acil homoserininas lactonas (acil-HSL) em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus*

3.1.1. Bioensaios com cultivos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* e cultivo misto e os biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026

A produção de acil-HSLs em cultivos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* foi avaliada utilizando os biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026.

Nestes testes observou-se que os cultivos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) tanto isoladamente como em cultivo misto apresentaram atividade positiva frente ao biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), quer em meio LB quanto em FI reconstituída; e, não apresentou atividade frente ao biossensor *C. violaceum* CV026 para ambos os meios.

Por sua vez, em todos os ensaios com *B. cereus* e para os dois biossensores testados, os resultados foram negativos, fato explicado pela característica Gram-positiva do microrganismo. Embora tenha sido evidenciada a ausência da produção de acil-HSLs pela cepa de *B. cereus*, a comunicação célula a célula poderia se reportar a outras classes de metabólitos indutores (**Figura 1**).

Neste trabalho, tivemos uma preocupação particular quanto a não produção de resultados falso positivos, pois algumas bactérias podem produzir enzimas β -galactosidase constitutivamente, que degradariam o reagente X-Gal mesmo na ausência do biossensor, resultando na coloração azul esverdeada característica. Assim, a partir do conhecimento de que *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) seria produtora desta enzima - fato este confirmado pela realização do teste bioquímico ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) – foram realizados ensaios biológicos com os extratos acetato de etila obtidos a partir dos cultivos das bactérias em meio LB.

3.1.2. Bioensaios com extratos de cultivos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* e cultivo misto e os biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026

A presença de acil-HSLs nos extratos de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *B. cereus* e cultivo misto destas duas bactérias foi avaliada utilizando os biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026 (**Figura 2**).

Os resultados dos testes com o extrato de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) evidenciaram atividade positiva frente aos biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026. No entanto, para o extrato de *B. cereus* não foi evidenciada atividade frente aos dois biossensores.

Apesar de, os bioensaios do cultivo misto terem apresentado resultados positivos com *A. tumefaciens* e negativos com *C. violaceum*, nos bioensaios utilizando os extratos dos cultivo misto (**item 2.2.2**) os resultados foram negativos para os dois biossensores.

A partir dessa constatação contraditória, partiu-se para um estudo mais aprofundado, a fim de identificar as acil-HSL produzidas pela cepa *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e buscar uma explicação para a não detecção destas moléculas pelos biossensores no extrato do cultivo misto, ou seja, a possível interação inter-espécies, e talvez a existência do mecanismo *quorum quenching*.

É interessante destacar o fato do extrato de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) ter apresentado atividade positiva frente ao biossensor *C. violaceum* CV026, e , no entanto, o teste com o cultivo das células (item 3.1.1) ter apresentado atividade negativa. Segundo Steindler e Venturi (2007), algumas bactérias podem produzir homoserinas com estruturas que não são detectáveis pelos biossensores, além da possibilidade de produzirem homoserinas lactonas em baixa concentração, abaixo do limite de sensibilidade dos biossensores. Estes fatores talvez justifiquem os resultados com o biossensor *C. violaceum* CV026 nos cultivos das células de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), além de demonstrar a importância da utilização de pelo menos dois biossensores nos experimentos.

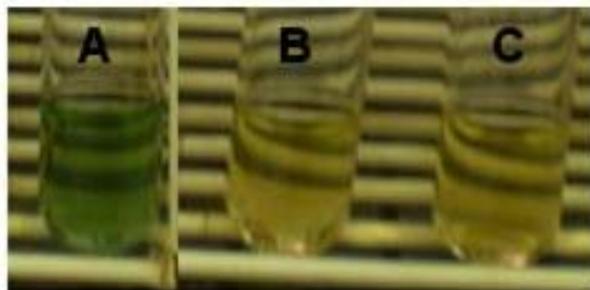


Figura 1. Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). **A.** *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.); **B.** *B. cereus* ATCC 14597; **C.** Controle negativo. Ensaio realizado em duplicata.

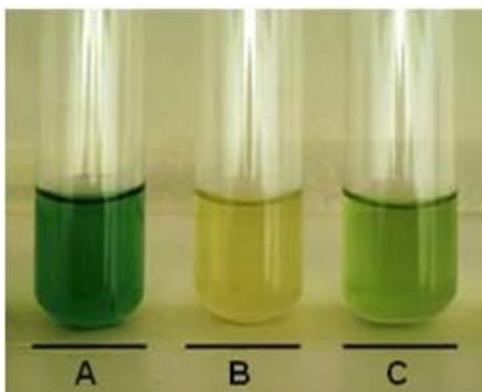


Figura 2. Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). **A.** (S)-dodecanoil-HSL (controle positivo); **B.** Controle negativo; **C.** Extrato acetato de etila de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), indicando presença de acil-HSL. Ensaio realizado em duplicata.

3.1.3. Detecção e caracterização de acil-homoserina lactonas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Os extratos obtidos (item 2.2.4) do meio de cultivo de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e cultivo misto foram submetidos a fracionamentos sendo estes totalmente acompanhados por CCD. Foram obtidas 81 frações (F) do extrato de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e 56 do extrato do cultivo misto. As frações foram testadas frente aos biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026 (Figuras 3 e 4).

Todas as frações bioativas (atividade positiva frente ao biossensor) foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, onde

foram monitorados os sinais com padrões de fragmentação característicos das acil-HSLs, como m/z 185, 143, 128, 102, 101, 100 e 85.

Nas análises das frações de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) observamos os sinais característicos de (1) *N*-heptanoil-HSL (M^+ m/z 213) nas frações F56-F61 (**Figura 5**), (2) *N*-dodecanoil-HSL (M^+ m/z 283), nas frações F63-F64 (**Figura 6**) e (3) *N*-tetradecanoil-HSL (M^+ m/z 311), nas frações F52-F56 (**Figura 7**).

A confirmação da estrutura das acil-HSLs foi realizada por co-injeção dos produtos naturais e sintéticos em CG-EM (**Figuras A1, A2 e A3**).

Na literatura encontramos apenas um trabalho, Lehner et al. (2005), que após o bioensaio caracterizou as acil-HSL (3-oxo-C6-HSL e 3-oxo-C8-HSL) produzidas por *E. sakazakii* utilizando a técnica de CCD, indicando a ocorrência do sistema *quorum sensing* nesta espécie bacteriana.

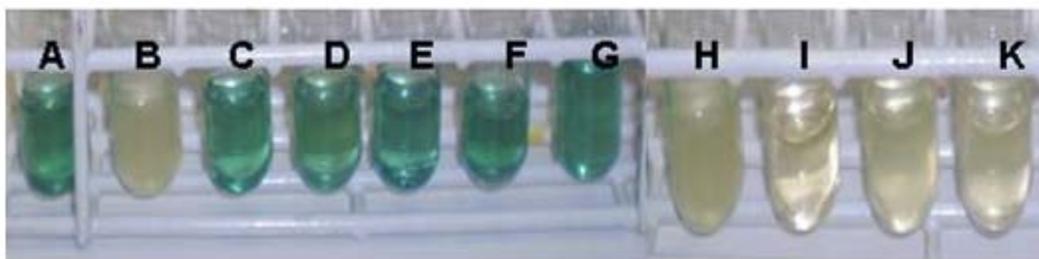


Figura 3. Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) nas frações do extrato de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). **A.** Controle positivo(S)-dodecanoil-HSL; **B.** Controle negativo; **C, D, E, F e G.** frações positivas ao bioensaio (F60 a 64); **F, G e H.** frações negativas ao bioensaio (F65 a 68).

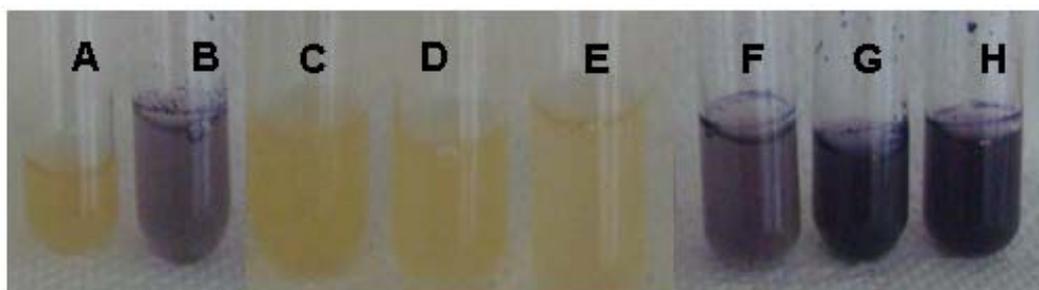


Figura 4. Atividade biológica com o biossensor *Chromobacterium violaceum* CV026 nas frações do extrato de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). **A.** Controle negativo.; **B.** Controle positivo (S)-heptanoil-HSL ; **C, D e E.** frações negativas ao bioensaio (F53,54 e 55); **F, G e H.** frações positivas ao bioensaio (F56, 57 e 58).

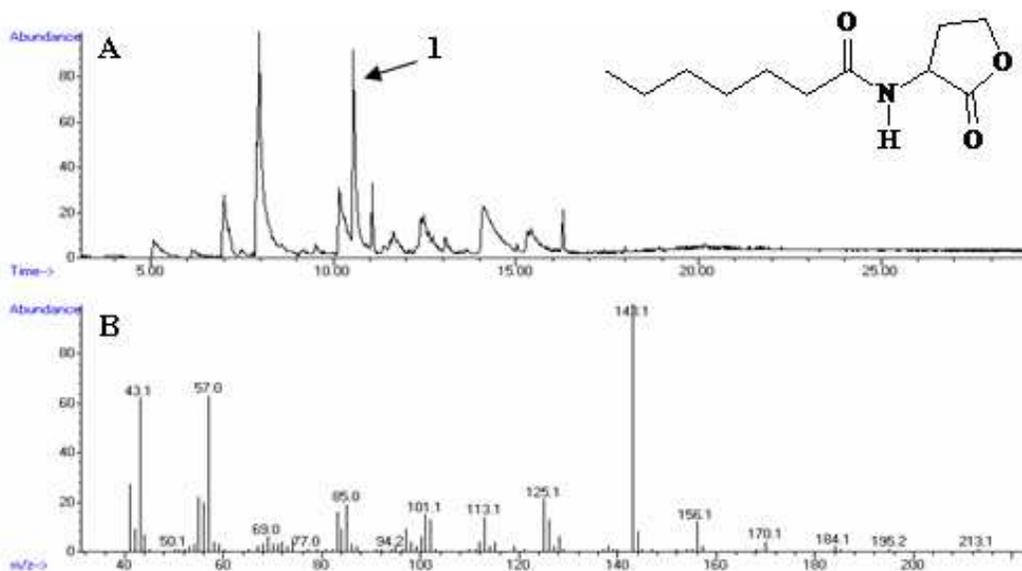


Figura 5. A. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração F59 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). B. Espectro de massas de N-heptanoil-HSL (1).

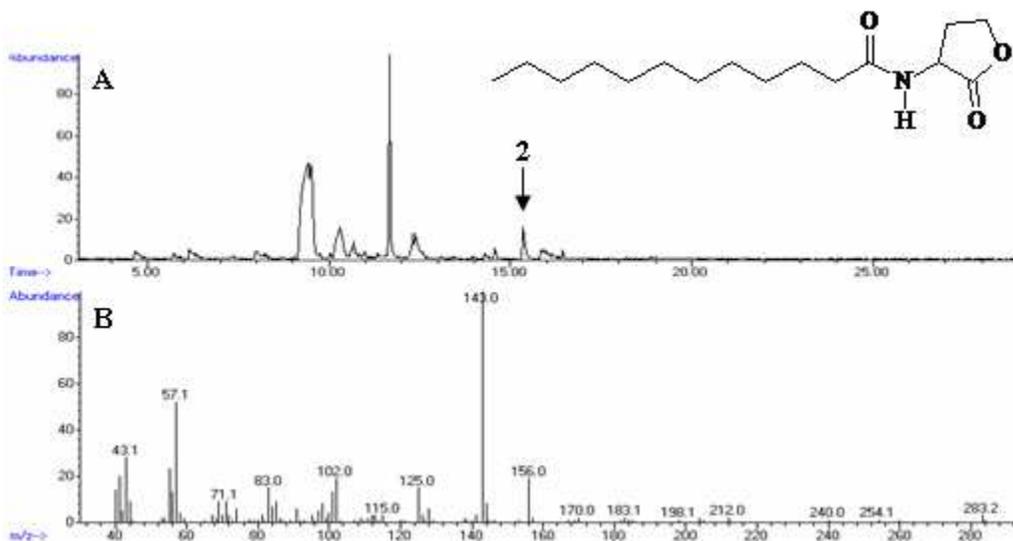


Figura 6. A. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração F63 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). B. Espectro de massas de N-dodecanoil-HSL (2).

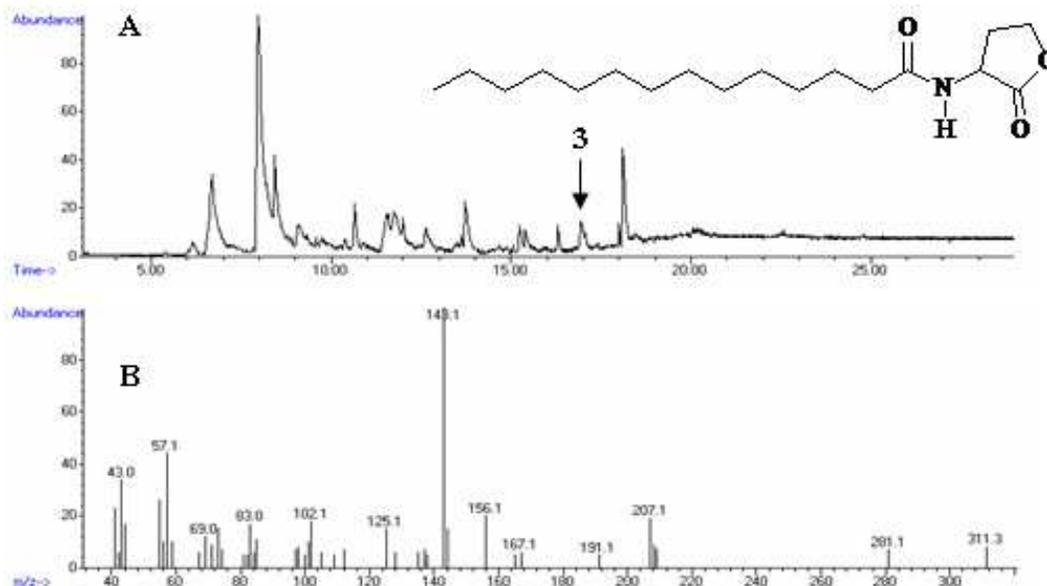


Figura 7. A. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração F55 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) B. Espectro de massas de N-tetradecanoil-HSL (**3**).

O extrato obtido do cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* também foi submetido ao fracionamento sendo esse totalmente acompanhado por CCD e bioguiado utilizando os biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026.

De um total de 56 frações do extrato do cultivo misto, somente a fração M42 mostrou-se ativa, e apenas frente ao biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) (**Figura 8**). Após análise desta fração por CG-EM observou-se a ocorrência de traço de *N*-dodecanoil-HSL, a qual também foi monitorada utilizando o modo SIM de detecção (**Figura 9**).

Esta quantidade traço muito provavelmente não ativa o biossensor. A provável explicação para o resultado positivo no bioensaio das células do cultivo misto (**item 3.1.1**) seria a ação da β -galactosidase, produzida constitutivamente por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), que teria degradado o X-GAL.

Relatos da literatura indicam que algumas espécies de *Bacillus* produzem *N*-acil-homoserina lactonase, uma enzima capaz de degradar acil-HSLs em um

processo denominado *quorum quenching* e/ou também possuem o gene *aiiA*, codificador desta enzima (ZHOU et al., 2006; DONG et al., 2002). A cepa de *B. cereus* ATCC 14579, utilizada neste trabalho é citada na literatura como detentora do gene *aiiA* que codifica N-acil homoserina lactonase (ZHOU et al., 2006), além de ter a seqüência do gene (3409487 a 3410239) no genoma desta cepa depositada no GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Dessa forma, as moléculas de acil-HSLs produzidas por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) muito provavelmente sofreriam um processo de degradação provocado por tal enzima.



Figura 8. Atividade biológica do extrato de cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). **A.** (S)-dodecanoil-HSL (controle positivo); **B.** Controle negativo; **C.** Fração F42. Os demais tubos são algumas das frações do extrato do cultivo misto, apresentando resultado negativo ao bioensaio. Ensaio realizado em duplicata.

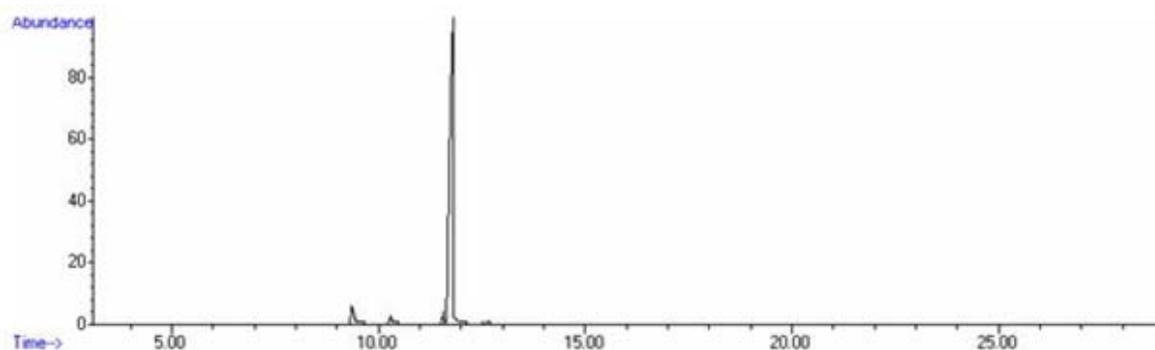


Figura 9. Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração M42 do extrato acetato de etila do cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus*, evidenciando o pico da N-dodecanoil-HSL.

3.1.4. Degradação de acil homoserinas sintéticas por *Bacillus cereus*

A confirmação da inativação das acil homoserinas lactonas por *B. cereus*, pode ser verificada através da adição prévia de acil-HSLs sintéticas a cultivos de *B. cereus*, antes da inoculação com os biossensores *A. tumefaciens* e *C. violaceum*. Em todos os ensaios, verificou-se reação negativa aos dois biossensores, reforçando a hipótese da possível degradação das acil-homoserinas lactonas por produtos do metabolismo de *B. cereus* (**Figuras 10 e 11**).

Esse resultado é mais um indício de que *B. cereus*, participa do processo *quorum quenching*. Porém, ressaltamos que trabalhos futuros devem ser realizados para detecção do gene codificador da enzima *N*-acil lactonase, a expressão da mesma, além das consequências da degradação das acil-HSLs em bactérias. Ulrich (2004), demonstrou que a expressão da *aiiA* lactonase de *B. anthracis* em *B. thailandensis*, eliminou completamente as moléculas sinalizadoras C8-HSL e C10-HSL, e reduziu os níveis de C6-HSL, causando, por exemplo, o aumento do tempo de geração celular. Em contrapartida, a expressão da *aiiA* lactonase de *B. cereus* A24, em *B. thailandensis*, reduziu as concentrações de C6-HSL, C8-HSL e C10-HSL a níveis não detectáveis, causando alteração na motilidade, entre outras.



Figura 10. Atividade biológica com o biossensor *C. violaceum* CV026. **A.** Controle positivo *N*-heptanoil-HSL com o biossensor; **B.** *B. cereus* com (S)-*N*-heptanoil-HSL, indicando a não detecção da acil-HSL pelo biossensor.

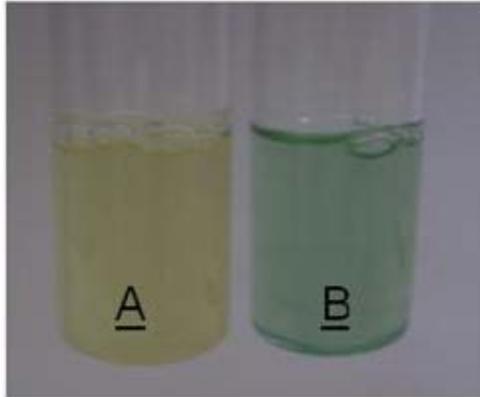


Figura 11. Atividade biológica com o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4): **A.** *B. cereus* com (S)-dodecanoil-HSL, indicando a não detecção da acil-HSL pelo biossensor; **B.** Controle positivo (S)-dodecanoil-HSL com o biossensor.

3.2. Avaliação da possível presença dos auto-indutores AI-2 e AI-3 em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*

3.2.1 Ocorrência do gene *luxS*, indicativo da presença do auto-indutor AI-2

A presença do gene *luxS* foi detectada na cepa de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* (**Figura 12**).

A presença do gene *luxS* é um forte indicativo da produção do auto-indutor AI-2, pois em todas as pesquisas conhecidas, a produção de AI-2 foi correlacionada à presença do gene *luxS*, cuja inativação causaria o mesmo efeito sobre a produção de AI-2 (SCHAUDER et al., 2001; XAVIER; BASSLER, 2003).

Porém a confirmação da presença de AI-2 apenas poderia ser obtida através da realização de outros ensaios como o da auto-indução, com a cepa mutante biossensora *Vibrio harveyi* BB170, onde a bioluminescência produzida pelo mutante seria uma resposta positiva à presença de moléculas de AI-2 (SURETTE; BASSLER, 1998; SURETTE; BASSLER, 1999).

Os ensaios de auto-indução não foram possíveis no presente trabalho, porém fica registrada a sua importância e a sugestão da sua utilização em futuros trabalhos.

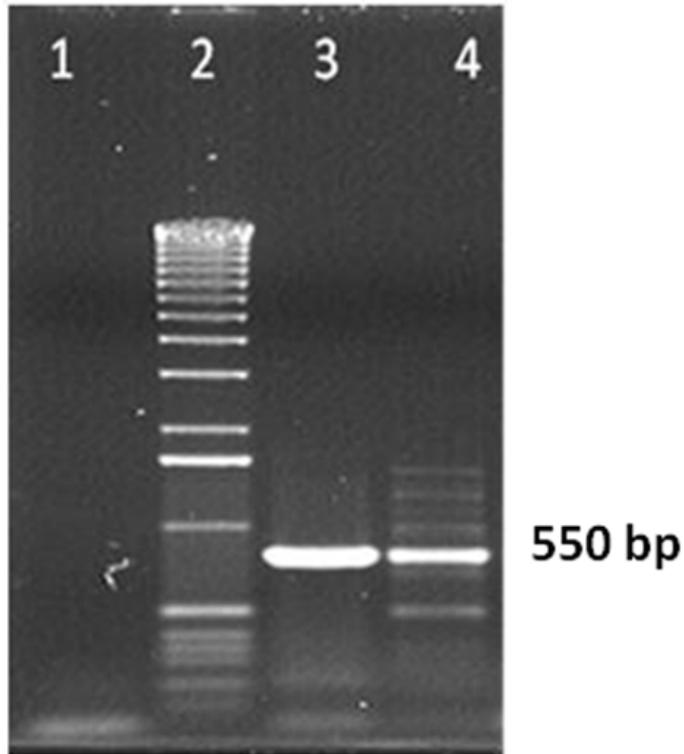


Figura 12. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *luxS* em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). **1.** Controle negativo; **2.** Marcador de peso molecular 1Kb. **3.** Controle positivo. **4.** Cepas *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.).

3.2.2. Pesquisa de auto- indutor AI-3 pela atividade de β -galactosidase

A presença de molécula sinalizadora de *quorum sensing* AI-3, foi investigada utilizando-se o ensaio de avaliação da atividade da β -galactosidase em meios pré condicionados com a utilização da cepa TEVS232 que é uma *E. coli* K12, que contém a fusão *LEE1::lacZ*. Os valores elevados de Unidades de Muller mostram que os meios pré-condicionados possuem quantidades suficientes de moléculas de autoindutor para ativação da transcrição do promotor LEE1 dependente do AI-3, sugerindo a sua produção.

Nestes ensaios, observamos que os meios pré condicionados foram capazes de induzir a alta atividade da enzima, indicando a presença de AI-3, nas cepas *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* conforme **Figura 13**.

A atividade do autoindutor AI-3 já foi observada em sobrenadantes de cepas de *E. coli* sorogrupos O26:H11 e O111 ac:H9, *Shigella* sp, *Salmonella*, *E.coli* comensal, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (READING; SPERANDIO, 2006; WALTERS, 2006)

O autoindutor AI-3, além de estar envolvido na sinalização inter-espécies, desempenha papel na comunicação inter-reino pelos sinais com os hormônios eucarióticos epinefrina e norepinefrina, ambos presentes no trato gastrointestinal (READING; SPERANDIO, 2006).

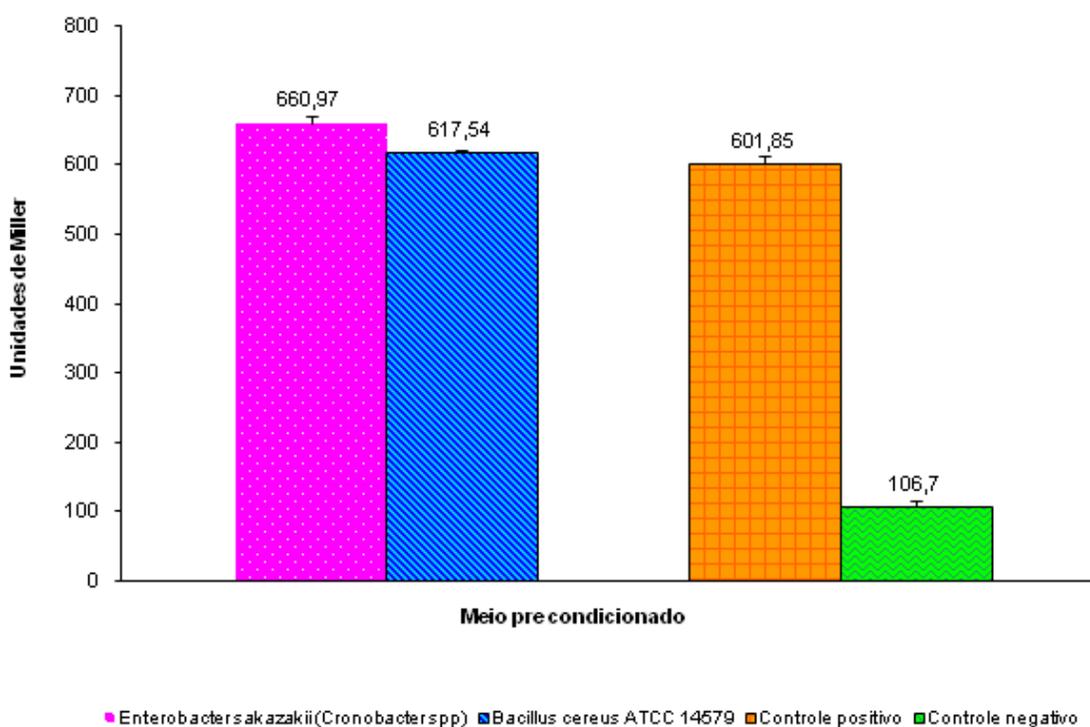


Figura 13. Atividade de β -galactosidase da amostra TEVS232 crescida em meios pré condicionados com amostras de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*.

3.2.3. Efeito de autoindutores (acil-HSL) sobre *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos

Devido à sua importância clínica, foram realizados ensaios para verificar a possível influência das moléculas sinalizadoras na sensibilidade de cepas de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* à agentes antimicrobianos.

Os testes de sensibilidade à antimicrobianos indicaram que a cepa de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) utilizada neste trabalho foi sensível aos antimicrobianos: Amicacina (30µg), Amoxicilina+Ac.clavulônico (10µg), Ampicilina (10µg), Aztreonam (30µg), Cefalotina (30µg), Cefepime (30µg), Cefotaxima (30µg), Cefoxitina (30µg), Ceftazidima (30µg), Ceftriaxona (30µg), Ciprofloxacima (5µg), Cloranfenicol (30µg), Gentamicina (10µg), Imipenem (10µg), Neomicina (30µg), Norfloxacina (10µg), Tetraciclina (30µg), Tombramicina (10µg), apresentou sensibilidade intermediária ao antimicrobiano Eritromicina (15 µg) e resistência à Vancomicina (30µg) (**Tabela 1**).

El-Sharoud et al. (2009) em testes de sensibilidade aos antimicrobianos demonstraram que os isolados de *Cronobacter* spp. pesquisados eram susceptíveis a ampicilina, furazolidona, gentamicina e estreptomina.

O tratamento de infecções por *E. sakazakii* com gentamicina em conjunto com ampicilina ou cloranfenicol sempre foi o mais tradicionalmente utilizado (GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005). Porém, infelizmente o microrganismo tem desenvolvido resistência a estes antimicrobianos. Kim et al. (2008) demonstraram que inúmeras cepas de *E. sakazakii* isoladas de alimentos foram resistentes à ampicilina e cefalotina. Neste trabalho a cepa estudada foi sensível a estes antimicrobianos.

Em relação ao microrganismo *B. cereus* utilizado neste trabalho, o teste de sensibilidade a antimicrobianos indicaram que a cepa foi sensível aos antimicrobianos: Amicacina (AMI 30µg), Ciprofloxacima (5µg), Cefoxitina (30µg), Cloranfenicol (30µg), Eritromicina (15µg), Gentamicina (10µg), Imipenem (10µg), Neomicina (30µg), Norfloxacina (10µg), Tetraciclina (30µg), Tombramicina (10µg)

e Vancomicina (30µg). Apresentou sensibilidade intermediária a: Aztreonam (30µg), Cefepime (30µg) e Ceftazidima (30µg) e resistência aos seguintes antimicrobianos: Cefalotina (30µg), Cefotaxima (30µg), Ceftriaxona (30µg) e Amoxicilina+Ac.clavulônico (10µg) (**Tabela 2**).

Luna et al. (2007) demonstraram a resistência de cepas de *B. cereus* a amoxicilina, ampicilina, ceftriaxona, penicilina e oxacilina e susceptibilidade a eritromicina, e clindamicina, em concordância com nosso trabalho.

Segundo, CLSI (2003) a Categoria de Interpretação 'Sensível' do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA), implica que a infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente com a dosagem de um agente antimicrobiano recomendado para esse tipo de infecção e patógeno, salvo quando de outra forma indicado; a Categoria de Interpretação 'Intermediária' do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana implica que uma infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente em locais do corpo, onde as drogas se concentram fisiologicamente ou quando for possível a prescrição de uma dosagem mais alta da droga que a habitual; na Categoria de Interpretação 'Resistente' do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, os isolados considerados resistentes não são inibidos pelas concentrações do agente antimicrobiano normalmente prescrito em tratamentos habituais (frequência e dosagem) e/ou caem na faixa em que a ocorrência de mecanismos de resistência antimicrobiana específicos é mais provável e a eficácia clínica não tem sido confiável em estudos clínicos.

Os autoindutores sintéticos C7-HSL, C12-HSL e C14-HSL adicionados a cultura de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* não exerceram efeito sobre a sensibilidade aos antimicrobianos, sugerindo que estas moléculas não estariam envolvidas em mecanismos de resistência a estes antimicrobianos. Porém ressalta-se a necessidade da realização de testes complementares mais aprofundados para confirmar este fato, como por exemplo, a utilização de cepas mutantes dos microrganismos, com e sem o gene produtor das acil-HSLs para verificar a diferença de resposta ao teste de sensibilidade aos antibiogramas.

Na literatura não foram encontrados trabalhos relacionados à influência das acil-HSL sobre a sensibilidade aos antibiogramas. Porém, Ahmed, Petersen e Scheie (2007) estudaram a associação entre o sistema de comunicação AI-2 e a susceptibilidade aos antimicrobianos. Os autores verificaram que uma cepa mutante de *Streptococcus anginosus*, deficiente na produção da molécula sinalizadora de AI-2 (pela deleção do gene *luxS*) apresentou aumento na susceptibilidade à eritromicina e ampicilina; indicando que a baixa susceptibilidade aos antimicrobianos na cepa selvagem pode ser consequência da sinalização mediada pela comunicação AI-2.

Tabela 1. Influência da adição de diferentes concentrações de acil homoserinas lactonas na sensibilidade de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) a antimicrobianos.

Antimicrobianos (concentração)	E	E 10 µmol/L C7-HSL	E 50 µmol/L C7-HSL	E 10 µmol/L C12-HSL	E 50 µmol/L C12-HSL	E 10 µmol/L C14-HSL	E 50 µmol/L C14-HSL
AMI (30µg)	S	S	S	S	S	S	S
AMC (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
AMP (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
ATM (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CFL (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CPM (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CTX (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CFO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CAZ (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CRO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CIP (5 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CLO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
GEN (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
IMP (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
NEO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
NOR (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
TET (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
TOB (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
VAN (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R
ERI (15 µg)	I	I	I	I	I	I	I

-E = *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), S – Sensível, I – Intermediária, R – Resistente.

-Resultados expressos em mm.

-Amicacina (AMI), Amoxicilina+Ac.clavulônico (AMC), Ampicilina (AMP), Aztreonam (ATM), Cefalotina (CFL), Cefepime (CPM), Cefotaxima (CTX), Cefoxitina (CFO), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Gentamicina (GEN), Imipenem (IMP), Neomicina (NEO), Norfloxacina (NOR), Tetraciclina (TET), Tombramicina (TOB), Vancomicina (VAN) e Eritromicina (ERI).

Tabela 2. Influência da adição de diferentes concentrações de acil homoserinas lactonas na sensibilidade de *Bacillus cereus* a antimicrobianos.

Antimicrobianos (concentração)	B	B	B	B	B	B	B
		10 µmol/L C7-HSL	50 µmol/L C7-HSL	10 µmol/L C12-HSL	50 µmol/L C12-HSL	10 µmol/L C14-HSL	50 µmol/L C14-HSL
AMI (30µg)	S	S	S	S	S	S	S
AMC (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R
ATM (30 µg)	I	I	I	I	I	I	I
CFL (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R
CPM (30 µg)	I	I	I	I	I	I	I
CTX (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R
CFO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CAZ (30 µg)	I	I	I	I	I	I	I
CRO (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R
CIP (5 µg)	S	S	S	S	S	S	S
CLO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
GEN (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
IMP (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
NEO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
NOR (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
TET (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
TOB (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
VAN (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
ERI (15 µg)	S	S	S	S	S	S	S

-B = *Bacillus cereus* ATCC 14579, S – Sensível, I – Intermediária, R – Resistente.

-Resultados expressos em mm.

-Amicacina (AMI), Ciprofloxacina (CIP), Cefoxitina (CFO), Cloranfenicol (CLO), Eritromicina (ERI), Gentamicina (GEN), Imipenem (IMP), Neomicina (NEO), Norfloxacin (NOR), Tetraciclina (TET), Tombramicina (TOB), Vancomicina (VAN), Aztreonam (ATM), Cefepime (CPM), Ceftazidima (CAZ), Cefalotina (CFL), Amoxicilina+Ac.clavulônico (AMC), Cefotaxima (CTX) e Ceftriaxona (CRO).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho evidenciou-se a capacidade de produção das homoserinas lactonas *N*-heptanoil-*HSL*, *N*-dodecanoil-*HSL*, *N*-tetradecanoil-*HSL* por cepa de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), fato este, ainda não reportado na literatura.

Para *B. cereus* ATCC 14579, confirmou-se a não produção de acil-*HSL* e evidenciou-se a capacidade da mesma em reduzir e/ou degradar as acil homoserinas lactonas quando em cultivo multi-espécies com *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), promovendo a conseqüente quebra da comunicação bacteriana (mecanismo *quorum quenching*).

O primeiro e importante passo foi dado para avaliação da ocorrência de outras classes de autoindutores como AI-2 e AI-3, com indicativos positivos da presença destes compostos. A identificação e caracterização destas estruturas, bem como de suas funções, portanto, deverão ser objetos de pesquisas futuras.

A presença de autoindutores não proporcionou alteração no perfil de sensibilidade dos microrganismos *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* aos antimicrobianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, N. A. A. M.; PETERSEN, F.C; SCHEIE, A. A. AI-2 quorum sensing affects antibiotic susceptibility in *Streptococcus anginosus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance**. p. 1-5, 2007.
- BENNET, R. W.; BELAY, N. Bacillus cereus. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4^o ed. Washington: APHA, 32, p. 311-316, 2001.
- CHRISTENSEN, A. B; RIEDEL, K.; EBERL, L.; FLODGAARD, L. R.; MOLIN, S., GRAM, L. GIVSKOV, M. Quorum sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. **Microbiology**, v. 149, p. 471-483, 2003.
- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Difusão**: norma aprovada – Oitava Edição, v. 23, 2003.
- DONG, Y. H., GUSTI, A. R., ZHANG, Q., XU, J. L.; ZHANG, L. H. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology** v.68,p. 1754–9, 2002.
- EL-SHAROUD,W.M.; O'BRIEN, S.; NEGREDO, C.; IVERSEN,C.; FANNING, S.; HEALY, B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. **BMC Microbiology**, p. 9, v. 24, 2009.
- FAO/WHO FOOD STANDARD. Codex alimentarius Official Standards. Official Codex Standard. List CAC/RCP 66- 2008. **CODE OF HYGIENIC PRACTICE FOR POWDERED FORMULAE FOR INFANTS AND YOUNG CHILDREN**. Disponível em:
www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/CXP_066e.pdf Acesso em : dezembro 2009.
- FLODGAARD, L. R.; CHRISTENSEN, A. B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; GRAM, L. Influence of food preservation parameters and associated microbiota on production rate, profile and stability of acylated homoserine lactones from food-

derived Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 145-156, 2003.

GRAM, L.; CHRISTENSN, A. B.; RAVN, L.; GIVSON, M. Production of acylate homoserine lactones by psychotropic members of the Enterobacteriaceae isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3458-3463, 1999.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J. B.; CHRISTENSN, A. B. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 79-97, 2002.

GURTLER, J. B.; KORNACKI, J. L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 1-34, 2005.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n.11, p. 443-454, 2003.

IVERSEN, C.; MULLANE, M.; MCCARDELL, B.; TALL, B. D.; LEHNER, A.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. Cronobacter Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis*, sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies 1*, and of three subspecies. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov. *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *Lactaridi* subsp. **International Journal System Environmental Microbiology**, 58, p. 1442–1447, 2008.

KIM, K.; JANG, S.; KIM, S. K.; PARK, J. H.; HEU, S. H.; RYU, S. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods . **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n 1-2, p. 196-203, 2008.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling

in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005.

LUNA, V. A.; KING, D. S.; GULLEDGE, J.; CANNONS, A. C.; AMUSO, P. T.; CATTANI, J. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etestw agar gradient diffusion methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 60, p. 555–567, 2007.

MARTINEZ, M. S. M.; UYTENDAELE, M.; RAJKOVIC, A.; NADAL, P.; DEBEVERE, J. Degradation of *N*-Acyl-L-Homoserine Lactones by *Bacillus cereus* in Culture Media and Pork Extract. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2329–2332, 2007.

MCCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S. R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J. H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B. W.; STEWART, G. S. A. B. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, p. 3703-3771, 1997.

OH, S. W., CHEN, P. C., KANG, D.-H. Biofilm Formation by *Enterobacter sakazakii* grown in artificial broth and infant milk formula on plastic surface. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, n. 15, p. 311–319, 2007.

POMINI, A. M., MANFIO, G. P., ARAÚJO, W. L., MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine lactones from *Erwinia psidii* IBSBF 435T, a guava phytopathogen (*Psidium guajava* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 16, p. 6262-6265, 2005.

POMINI, A. M.; MEIRELLES, L. D. P.; MARSAIOLI, A. J. Acyl-Homoserine Lactones Produced by *Pantoea* sp. Isolated from the “Maize White Spot” Foliar Disease. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 55, p. 1200-1204, 2007.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, p. 1–11, 2006.

SCHAUDER, S., KEVAN, S., SURETTE, M. G., BASSLER, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 463-476, 2001.

SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. *Bacillus cereus* Food Poisoning and its Toxins. **Journal of Food Protection**, 68, n. 3, p. 636-648, 2005.

SIRCILI, M. P. "**Quorum sensing**": **Estudo do fenômeno em amostras de Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) típicas e atípicas**. São Paulo, 2004. 98p. Tese (Doutor em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

SMITH, J. L.; FRATAMICOMP. M.; NOVACK, J. S. *Quorum sensing*: A primer for food Microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J. B. *Quorum sensing* controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 15196-15201, 1999.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; GIRON, J. A.; KAPER, J. B. *Quorum sensing* is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5187-97, 2001.

STEINDLER, L.; VENTURI, V. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. **FEMS Microbiology Letters**, 266, p. 1-9, 2007.

SURETTE, M. G.; MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 1639-1644, 1999.

SURETTE, M. G. BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 95, p. 7046-7050, 1998.

ULRICH, R. L. *Quorum quenching*: Enzymatic disruption of *N*-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.10, p. 6173 – 6180, 2004.

WALTERS, M. **Regulation of the EHEC LEE pathogenicity island by bacterial and host signaling**. Dallas, Texas June, 2006. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy. Faculty of the Graduate School of Biomedical Sciences. University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas.

WATERS, C. M, BASSLER, B. *Quorum sensing*: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 319-346, 2005.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. **Current Opinion in Microbiology**, 6: 191-197, 2003.

ZHOU, Y.; WEI-XING, Y.; ZHU, C.; SUN,M.; YU, Z. N. Ethanol tolerance, yield of melanin, swarming motility and growth are correlated with the expression levels of *aiiA* gene in *Bacillus thuringiensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 967-974, 2006.

APÊNDICE

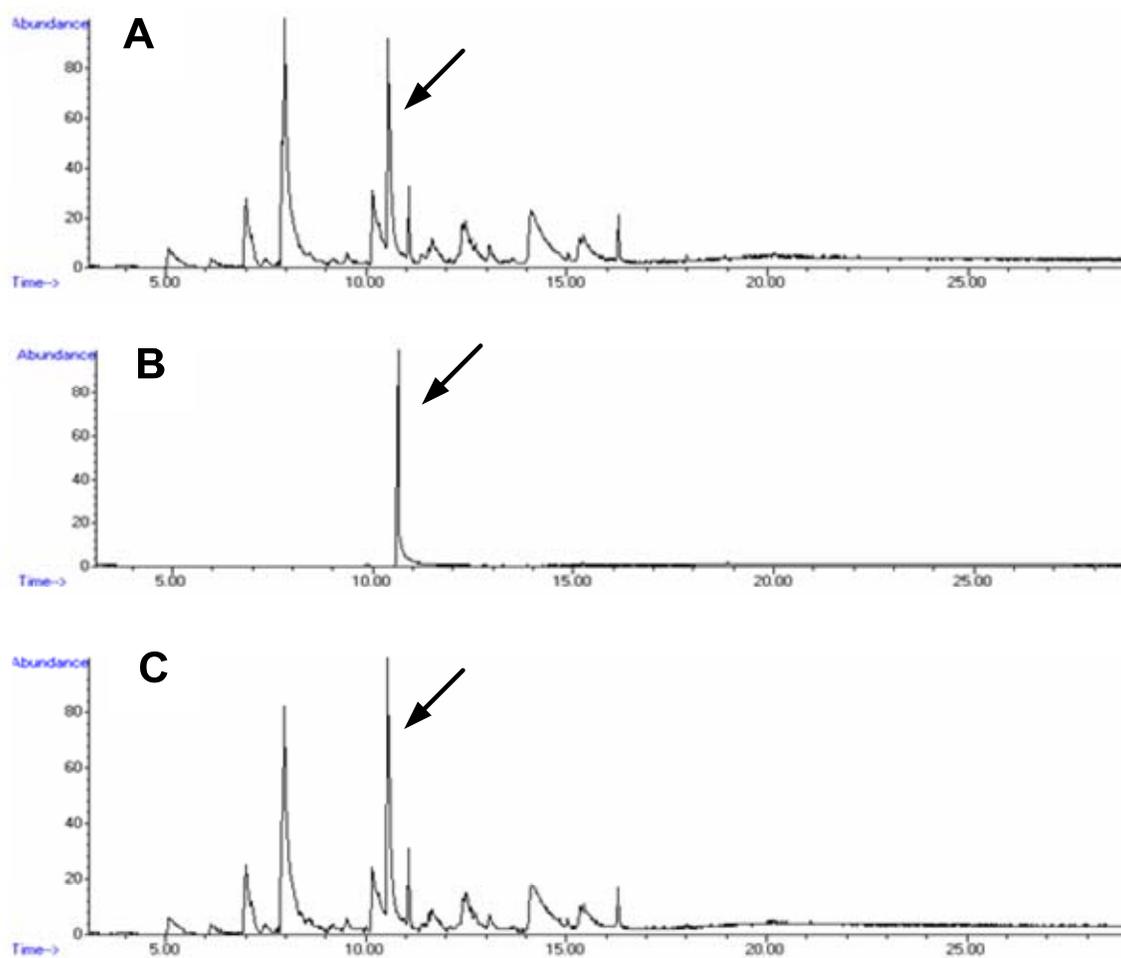


Figura A1. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. Fração F59 do extrato acetato de etila do cultivo de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). B. Produto sintético (\pm)-*N*-heptanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F59 com o produto sintético.

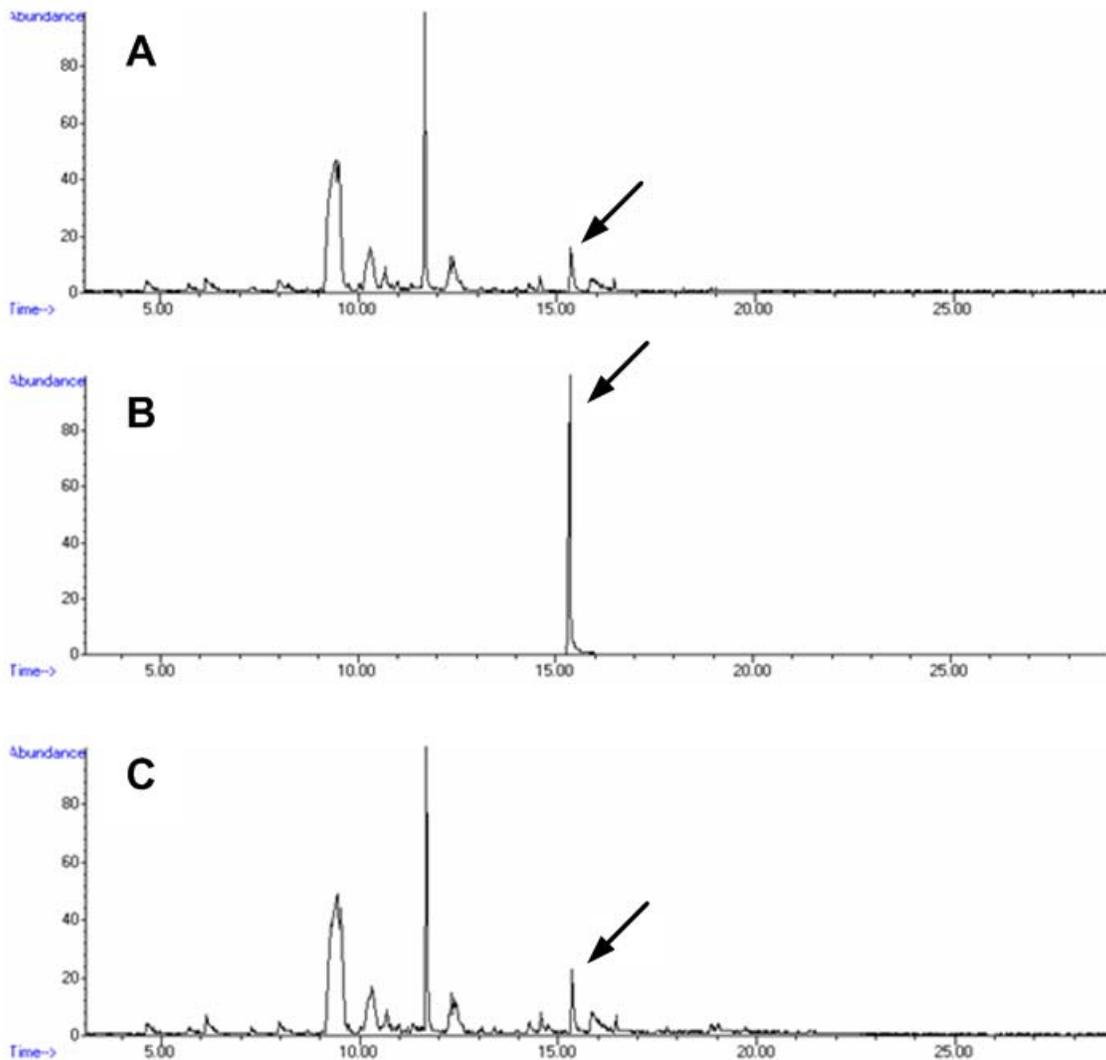


Figura A2. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. Fração F63 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) . B. Produto sintético (\pm)-*N*-dodecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F63 com o produto sintético.

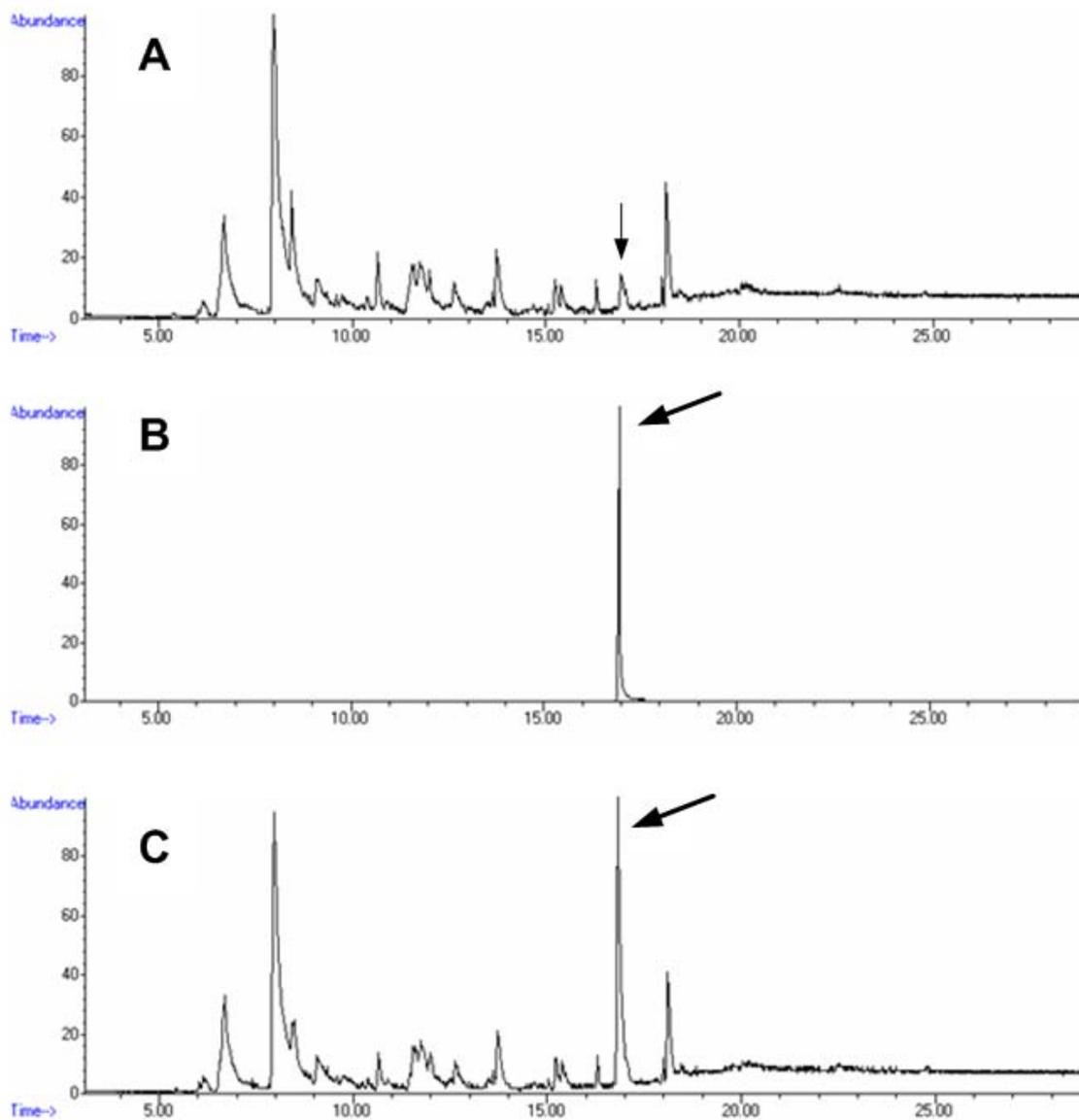


Figura A3. Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV): A. Fração F55 do extrato acetato de etila do cultivo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp). B. Produto sintético (\pm)-N-tetradecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F55 com o produto sintético.

CONCLUSÕES GERAIS

Os microrganismos *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* apresentam a capacidade em aderir e formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável AISI 304-#4 e a composição do meio de cultivo influencia no perfil de desenvolvimento do biofilme. Em particular, a fórmula infantil pode ser considerada um excelente veículo para a contaminação microbiana de superfícies que entram em contato com este produto durante a sua produção e/ou reconstituição.

Em cultivo misto de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* observou-se que ambos podem coexistir num mesmo ambiente e apesar da competição, podem aderir e formar biofilmes isolado ou conjuntamente no ambiente do processamento de fórmulas infantis.

O controle do desenvolvimento de biofilmes por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e instalações utilizadas no processamento de fórmulas infantis deve passar necessariamente pela aplicação de programas de higienização eficientes visando evitar estágios avançados de adesão e possível formação de biofilmes resistentes aos agentes sanitizantes.

E. sakazakii (*Cronobacter* spp.) apresenta a capacidade de produção das homoserinas lactonas *N*-heptanoil-*HSL*, *N*-dodecanoil-*HSL* e *N*-tetradecanoil-*HSL* em fato este, ainda não reportado na literatura. A pesquisa revelou a possível presença de outros autoindutores como AI-2 e AI-3 .

Bacillus cereus ATCC 14579 possui a capacidade de reduzir e/ou degradar as acil homoserinas lactonas, causando a quebra da comunicação bacteriana (mecanismo *quorum quenching*).