

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ESTUDO DOS MECANISMOS RELACIONADOS COM A FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR *Pseudomonas fluorescens* ISOLADAS DE LEITE CRU DE
BÚFALA**

KARINE LAUER CRUZ

Orientador: Prof^(a). Dr^(a). Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre
Fevereiro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ESTUDO DOS MECANISMOS RELACIONADOS COM A FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR *Pseudomonas fluorescens* ISOLADAS DE LEITE CRU DE
BÚFALA**

Karine Lauer Cruz
Biomédica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Fevereiro/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Cruz, Karine Lauer

ESTUDO DOS MECANISMOS RELACIONADOS COM A FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Pseudomonas fluorescens* ISOLADAS DE LEITE CRU DE BÚFALA / Karine Lauer Cruz. -- 2018.

59 f.

Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Pseudomonas fluorescens*. 2. bactérias psicrotróficas. 3. leite de búfala. 4. biofilme microbiano. I. Motta, Amanda de Souza da, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento desse trabalho. Em especial ao meus pais, Lisandra e Luciano, que sempre incentivaram minha educação, principalmente naqueles momentos onde o cansaço e desânimo prevaleciam, me fazendo não desistir de meus objetivos, sempre confiando em mim. Pelos sacrifícios empregados em minha educação. Agradeço todos os conselhos, ensinamentos e exemplos de vida.

Ao meu namorado Marcos, que me ajudou em todos os passos desse trabalho, me dando todo suporte necessário.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão. Ao primo Louidi Lauer Albornoz, que mesmo em outro país estava ali para aquela ajuda desesperada aos finais de noite.

À minha orientadora Prof. Dra Amanda de Souza da Motta, pela paciência e por ter me recebido novamente de braços abertos, estando sempre disponível para tirar dúvidas e passar seus ensinamentos.

Agradeço a todos os participantes do laboratório de biologia molecular do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), principalmente a Dra Fabiana Quoos Mayer e sua IC Isadora pelos ensinamentos moleculares e ajuda incansável. À Dra Daia Morales (HCPA) na finalização desse estudo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao ICBS, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, pela estrutura e por oportunizar a realização desta pesquisa. Aos funcionários, professores e colegas do Laboratório 222-C.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

ESTUDO DOS MECANISMOS RELACIONADOS COM A FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Pseudomonas fluorescens* ISOLADAS DE LEITE CRU DE BÚFALA

Autor: Karine Lauer Cruz

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Amanda de Souza da Motta

RESUMO

Pseudomonas fluorescens é uma das bactérias psicrotróficas mais comumente isolada em leite cru e desempenha um papel importante na deterioração dos alimentos, pois são capazes de produzir enzimas termoresistentes e formar biofilmes. Este trabalho teve como objetivo explorar a capacidade de formação de biofilmes por duas cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 provenientes de leite cru de búfala refrigerado. Para esta pesquisa foram realizados testes de proteólise, produção de exopolissacarídeos, ensaios de motilidade, avaliação da formação de biofilme em material de poliestireno e aço inoxidável, e por fim a visualização da estrutura do biofilme formado através de microscopia eletrônica de varredura. As duas cepas testadas apresentaram proteólise em ágar leite. Para a pesquisa de produção de exopolissacarídeo e ensaio de motilidade, estes foram ausentes ou fracamente produzidos pela cepa de *P. fluorescens* PL7.1 e produzidos em parte pela cepa de *P. fluorescens* PL5.4. As cepas foram capazes de formar biofilme em material de poliestireno, sendo a melhor condição evidenciada a temperatura de 7 °C pelo período de 72 horas. Para o teste de formação de biofilme em aço inoxidável a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 testada foi capaz de produzir biofilme e manter essa estrutura por até 72 horas em temperatura de refrigeração. Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar o biofilme produzido pela cepa de *P. fluorescens* PL5.4 e sua forma plantônica, porém não foi possível observar produção de exopolissacarídeos e estruturas de motilidade. Considerando a origem das cepas é relevante salientar a importância da realização de procedimentos de limpeza e desinfecção para que se possa diminuir a contaminação por essas bactérias e prolongar a vida útil da matéria prima e seus derivados.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (99 p.) Fevereiro, 2018.

STUDY OF THE MECHANISMS RELATED TO THE FORMATION OF BIOFILMES BY *Pseudomonas fluorescens* ISOLATED OF RAW MILK OF BUFFALA

Author: Karine Lauer Cruz

Advisor: Prof. Dr. Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens is one of the most commonly isolated psychotropic bacteria in raw milk and plays an important role in the deterioration of food because they are able to produce thermoresistant enzymes and to form biofilms. This work aimed to explore the biofilm formation capacity of two strains of *P. fluorescens* PL5.4 and PL7.1 buffalo raw milk in cooling tank. For this research were carried out tests of proteolysis, production of exopolysaccharides, motility tests, evaluation of the biofilm formation in polystyrene material and stainless steel, and finally the visualization of biofilm structure formed by scanning electron microscopy. The two isolates tested showed proteolysis in milk agar. For exopolysaccharides production and motility testing, these were absent or weakly respectively *P. fluorescens* PL7.1 strain and produced in part by the *P. fluorescens* PL5.4 strain. The strains were able to form biofilm in polystyrene material being a better condition evidenced at 7 °C for 72 hours. For the biofilm formation test in stainless steel the *P. fluorescens* PL5.4 strain was able to produce biofilm and maintain this structure for up to 72 hours at refrigeration temperature. Through scanning electron microscopy, it was possible to observe the biofilm produced by the isolate *P. fluorescens* PL5.4 and its planktonic form, but it was not possible to observe of production exopolysaccharides and motility structures. Considering the origin of the isolates, it is important to emphasize the importance of cleaning and disinfection so that contamination by bacteria can be reduced and extend a useful life of the raw material and its derivatives.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (99 p.) February, 2018.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	O leite de búfala como matéria-prima	3
3.2	Impacto da <i>Pseudomonas</i> spp. na indústria de produtos lácteos ...	4
3.3	Características da <i>Pseudomonas fluorescens</i>	6
3.4	Biofilmes microbianos	8
4	MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1	Isolados bacterianos e condições de cultivo	12
4.2	Confirmação da identificação das cepas bacterianas via MALDI-TOF/MS	12
4.3	Avaliação de atividade proteolítica em ágar leite	13
4.4	Teste de suscetibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos	13
4.5	Investigação da produção de exopolissacarídeos (EPS) por meio sólido contendo Calcofluor	14
4.6	Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Twitching	14
4.7	Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Swarming	15
4.8	Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme ..	15
4.9	Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme com leite residual	16
4.10	Efeitos da co-cultura de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 no biofilme de <i>Pseudomonas fluorescens</i> PL5.4	16
4.11	Avaliação da formação de biofilme da cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> PL5.4 em superfícies de aço inoxidável	17
4.12	Avaliação da formação de biofilme da cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> PL5.4 em superfícies de aço inoxidável com leite residual	18
4.13	Microscopia Eletrônica de Varredura	18
4.14	Análise estatística	19
5	RESULTADOS	20
5.1	Confirmação da identificação das cepas bacterianas via MALDI-TOF/MS	20
5.2	Avaliação de atividade proteolítica em ágar leite	20
5.3	Teste de sensibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos	20
5.4	Investigação de produção de exopolissacarídeo (EPS) por meio sólido contendo Calcofluor	21
5.5	Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Twitching	22
5.6	Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Swarming	23
5.7	Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme ..	23
5.8	Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme	

	com leite residual	23
5.9	Efeitos do co-cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 sobre a formação de biofilme de <i>Pseudomonas fluorescens</i> PL5.4	24
5.10	Avaliação da formação de biofilme da cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> PL5.4 em superfícies de aço inoxidável	24
5.11	Avaliação da formação de biofilme da cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> PL5.4 em superfícies de aço inoxidável com leite residual	26
5.12	Microcopia Eletrônica de Varredura	28
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	40
8	REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Scores para a identificação de bactérias via MALD-TOF/MS..	20
Tabela 2. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 e PL7.1.....	21
Tabela 3. Presença e ausência da fluorescência das cepas testadas em meio Calcofluor expostas a luz UV.....	22
Tabela 4. Formação de biofilme das cepas de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 e PL7.1 nas temperaturas de 7, 23 e 37 °C, com e sem leite residual.....	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Visualização da fluorescência das cepas de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 e PL7.1 e controles em meio de cultura com adição de Calcofluor com lâmpada LW UV-A Xelux® 365 nm	22
Figura 2. Contagem de células sésseis da cepa de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 em superfície de aço inoxidável em meio de cultura TSB, nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperaturas de 7, 23 e 30 °C	25
Figura 3. Contagem de células planctônicas da cepa de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 em meio de cultura TSB, nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperaturas de 7, 23 e 30 °C	26
Figura 4. Contagem de células sésseis da cepa de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 em superfície de aço inoxidável em meio de cultura TSB e TSB com leite residual, nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperatura de 7 °C	27
Figura 5. Contagem de células planctônicas da cepa de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 em meio de cultura de TSB e TSB com leite residual, nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperatura de 7 °C	28
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura da cepa de <i>P. fluorescens</i> PL5.4 em biofilme e em sua forma planctônica	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AHL	Lactona N-acil-homosserina
c-di-GMP	Diguanilato Monofosfato Cíclico
DO	Densidade Óptica
EPS	Exopolissacarídeos
h	Hora
IN 62	Instrução Normativa 62
L	Litro
LW UV-A	<i>long wave ultraviolet</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MALDI-TOF/MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
OprF	Porina F
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
QS	<i>Quorum Sensing</i>
rpm	rotação por minuto
s	segundo
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> (Ágar soja tripticase)
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo soja tripticase)
UHT	<i>ultra high temperature</i>
unid	unidade
v/v	volume/volume
µg	micrograma
µL	microlitro

1. INTRODUÇÃO

A presença de micro-organismos no leite cru pode ocasionar alterações que conseqüentemente afetarão suas características físico-químicas, podendo tornar os produtos finais impróprios para o consumo. Os micro-organismos podem contaminar o processo de produção, através da falta de higienização durante as etapas do processo de ordenha, do uso de água de má qualidade e de limpeza e desinfecção inadequadas dos equipamentos e tanques de armazenamento.

Como alternativa para o crescimento desses micro-organismos contaminantes, opta-se por refrigerar essa matéria-prima, porém esse processo acaba por selecionar bactérias psicotróficas. Estas, por sua vez, têm a capacidade de produzir enzimas com caráter deteriorante, e são resistentes aos processos de tratamento térmico, ocasionando uma diminuição na vida útil de derivados de produtos lácteos.

Outro problema que vem sendo discutido atualmente é a capacidade dessas bactérias psicotróficas em formar biofilmes. A formação de biofilmes acaba por dificultar a higienização de superfícies, onde nem sempre os sanitizantes vão conseguir eliminar completamente essas estruturas predispondo a contaminações cruzadas e/ou recontaminações ao longo do processo de produção de alimentos.

A adesão desses micro-organismos e subsequente formação de biofilmes em superfícies como poliestireno, aço inoxidável já foi descrita para diversos gêneros bacterianos. Sabe-se que esses materiais também são de uso rotineiro em diversos serviços da área de alimentação. O gênero *Pseudomonas* sp., vem sendo bastante citado em estudos nos últimos anos como um importante formador de biofilme, possuindo um impacto negativo no âmbito industrial.

Por esses motivos o presente trabalho procurou investigar o processo de formação de biofilmes por *Pseudomonas fluorescens* isoladas de leite cru de búfala.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho propõe avaliar a formação de biofilme por duas cepas de *Pseudomonas fluorescens* provenientes de leite cru de búfala refrigerado.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos, produção de exopolissacarídeo e a motilidade das cepas de *Pseudomonas fluorescens*.

2.2.2 Avaliar a capacidade de formação de biofilme das cepas de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies de poliestireno.

2.2.3 Avaliar a capacidade de formação de biofilme em co-cultivo na presença de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

2.2.4 Avaliar a capacidade de formação de biofilme da cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 em superfícies de aço inoxidável.

2.2.5 Observar a estrutura do biofilme formado em aço inoxidável por microscopia eletrônica de varredura.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O leite de búfala como matéria-prima

A produção de leite de búfala vem crescendo no mercado Brasileiro, sendo principalmente utilizado para a produção de derivados lácteos. Sua produção mundial equiparada aos demais tipos de leite fica em torno de 12,8%, sendo o segundo tipo de leite mais produzido no mundo. O Rio Grande do Sul representa 6% do rebanho bubalino nacional (Bernardes, 2014).

O leite de búfala pode ser consumido fresco ou usado como matéria-prima pela indústria de laticínios (Bailone et al., 2017). Ele contém maiores teores de proteína, gorduras, minerais quando comparado ao leite de vaca. Os valores de acidez também são mais elevados, sendo outra característica importante (Bernardes, 2014). Essa disponibilidade de nutrientes no leite o torna um meio favorável ao crescimento microbiano (Bailone et al., 2017). A qualidade desta matéria prima está intimamente relacionada ao manejo de ordenha, sendo a qualidade da coleta essencial para a fabricação de um bom produto (Nucera et al., 2016).

O leite recém-ordenhado apresenta baixo número de micro-organismos, não apresentando risco a saúde. A contaminação do leite cru por micro-organismos pode ocorrer a partir do próprio animal, do homem e do ambiente (Nucera et al., 2016). Os fatores de contaminação do leite incluem a limpeza inadequada dos equipamentos de ordenha, procedimentos precários de higiene e mastite (Cleto et al., 2012; Oliveira et al., 2015). O leite poderá ser contaminado ao entrar em contato com a superfície de equipamentos de ordenha ou tanques de refrigeração (Bailone et al., 2017). Um leite com altas contagens microbiológicas sofrerá alterações que conseqüentemente afetarão as características finais de seus derivados (Nucera et al., 2016).

No Rio Grande do Sul existem poucas propriedades produtoras de leite bubalino. A produção de leite de búfalo no Sul do Brasil é de 130 mil litros por ano, correspondendo em torno a 8% do total da produção no país (Ricci e Domingues, 2012; Bogo et al., 2017). Atualmente no Brasil não há legislação que defina os padrões de identidade e da qualidade do leite bubalino. Dessa forma, o leite cru de búfalo segue a legislação da Instrução Normativa 62 (IN 62

- MAPA) para leite bovino (Brasil, 2011).

A temperatura e o período de armazenamento antes da pasteurização irão determinar o desenvolvimento da microbiota contaminante, já que esses fatores estão diretamente ligados com a multiplicação dos mesmos. Esse potencial de multiplicação poderá causar alterações físico-químicas que poderão tornar o produto impróprio para a industrialização e o consumo (Baiolone et al., 2017; Bogo et al., 2017). A IN 62 - MAPA indica o tempo de armazenamento de no máximo 48 horas e a uma temperatura de conservação do leite na propriedade rural de 7 °C a 10 °C no estabelecimento processador (Brasil, 2011).

A refrigeração de leite cru como alternativa para o crescimento de micro-organismos mesófilos levou à criação de condições seletivas para bactérias psicotróficas (Oliveira et al., 2015; Puga, Orgaz e SanJose, 2016).

A microbiota psicotrófica contaminante está composta de espécies bacterianas gram-negativas e gram-positivas. Os principais gêneros encontrados são *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium* e *Moxarella* (Cleto et al., 2012; Oliveira et al., 2015; Pisano et al., 2016).

3.2 Impacto da *Pseudomonas* spp. na indústria de produtos lácteos

Pseudomonas spp. representam um problema tanto na produção primária como no processo de transformação do leite. Podem causar mastite e alterações dos produtos lácteos, mesmo que estes sejam mantidos sob rigorosas temperaturas de refrigeração (Nucera et al., 2016). Bactérias do gênero *Pseudomonas* são frequentemente isoladas em leite e produtos lácteos refrigerados, embora estejam presentes em menos de 10% da microbiota do leite cru recém ordenhado.

A contaminação do leite por bactérias desse gênero pode originar-se através de água com qualidade inadequada, mas também do contato com superfícies e tubulações das linhas de processamento (Oliveira et al., 2015; Magro et al., 2016; Rossi et al., 2016).

Pseudomonas apresentam características psicrotróficas, podendo crescer a temperaturas entre 0-7 °C. Bactérias psicrotróficas são micro-organismos que tem a capacidade de crescer em temperaturas baixas, porém suas temperaturas ótimas de crescimento são de 15 a 20 °C (Oliveira et al., 2015). Bactérias psicrotróficas não são resistentes ao processo de pasteurização, porém são capazes de produzir enzimas termorresistentes. Muitas das enzimas produzidas mantêm uma atividade significativa após a pasteurização (72-75 °C / 15-20 s) e até ao tratamento com UHT (*ultra high temperature*) (130-150 °C / 2-4 s) podendo posteriormente degradar proteínas e gorduras presentes no leite (Nörnberg et al., 2011; Cleto et al., 2012; Oliveira et al., 2015). A atividade dessas enzimas passa a ser importante quando a contagem de micro-organismos psicrotróficos ultrapassa a faixa de 10^6 - 10^7 UFC/mL, pois estão relacionadas a perda na qualidade e redução da vida de prateleira de produtos lácteos. Esse problema é antigo, porém persistente nos dias atuais (De Jonghe et al., 2011; Oliveira et al., 2015).

Muitas *Pseudomonas* vivem como comensais de plantas, utilizando nutrientes exsudados da superfície das mesmas e sobrevivendo aos estresses ambientais, ocupando locais protegidos e fornecidos por sua arquitetura. Entre os comensais de plantas, está presente a *P. fluorescens* que pode desempenhar um papel de controle biológico, por sua competência em produzir antibiótico e outros metabólitos secundários que são tóxicos para os patógenos presentes nas plantas (Nucera et al., 2017). São capazes de produzir também sideróforos, sistema de secreção do tipo III e biofilmes (Scales et al., 2014).

Pseudomonas fluorescens, podem ser frequentemente isoladas de leite cru refrigerado (Rossi et al., 2016). Em um estudo realizado por Nucera et al. (2016), este confirmou a presença de *P. fluorescens* (45% dos isolados) como a espécie predominante no ambiente de laticínios. Em 2010, foi descrito que consumidores europeus notaram que alguns produtos de mozzarella tinham pigmentação azul ao invés de branco e continham níveis elevados de *P. fluorescens* de até 10^6 UFC/g (Scales et al., 2014; Magro et al., 2016; Pisano et al., 2016).

3.3 Características da *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas spp. pertencem a família Pseudomonadaceae da subclasse *Gammaproteobacteria*. Estes micro-organismos são bacilos gram-negativos, móveis constituídos por um ou mais flagelos polares. São aeróbios, não-fermentativos, catalase e oxidase positivos, mesofílicos, psicrotolerantes e não formadores de esporos (Scales et al., 2014; Rossi et al., 2016; Nishimura et al., 2017).

Das muitas espécies dentro do gênero *Pseudomonas*, o complexo *Pseudomonas fluorescens* constitui 20% do gênero. Novos estudos de taxonomia através de testes genotípicos demonstram que muitas *Pseudomonas* isoladas e identificadas como espécies de *Pseudomonas fluorescens* estão sendo reclassificadas como novas espécies dentro de um "complexo de espécies" de *Pseudomonas fluorescens*. Identifica-se atualmente 52 espécies dentro deste grupo, compartilhando muitas características fenotípicas (Scales et al., 2014; Garrido-Sanz et al., 2017). Elas estão divididas em subgrupos que diferem na análise da sequência de multilocus (*multilocus sequence analysis* - MLSA) e da análise filogenômica. O complexo de *Pseudomonas fluorescens* contém 8 filogrupos que são *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas jessenii*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas protegens* (Garrido-Sanz et al., 2017). Estas bactérias são descritas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (*plant growth-promoting rhizobacteria* – PGPR), devido a sua capacidade de suprimir doenças causadas por agentes patogênicos através da colonização competitiva de tecidos vegetais, produção de antibióticos, indução de fitohormônios ou metabólitos que modificam o equilíbrio hormonal das plantas (Garrido-Sanz et al., 2016; Garrido-Sanz et al., 2017; Hernández-Salmerón, Moreno-Hagelsieb e Santoyo, 2017).

A enorme heterogeneidade fenotípica e genética mostrada pelas cepas pertencentes ao grupo *P. fluorescens* levou a uma difícil avaliação de sua filogenia, pois não engloba completamente a taxonomia e, a proposta de que um complexo de espécies esteja moldando a filogenia do grupo *P. fluorescens*. As dificuldades dentro desse grupo são as descrições frequentes

de novas espécies, e a inclusão de cepas nesse grupo (Garrido-Sanz et al., 2016).

As cepas de *P. fluorescens* isoladas de amostras ambientais têm uma faixa de crescimento de 4 a 32 °C, enquanto para os isolados de seres humanos e outros mamíferos esta faixa estende-se para até 37 °C (Scales et al., 2014). Elas são geralmente encontradas no solo e água, podendo ser isoladas aeróbicamente em meios contendo diferentes fontes de carbono e anaeróbicamente em meios contendo nitrato. Estão comumente associadas com a deterioração de alimentos (ovos, carnes, peixes e leite). São também frequentemente isoladas a partir de espécimes clínicos (Nishimura et al., 2017). Estudos identificaram a bactéria *P. fluorescens* em abundância na microbiota de vários locais no corpo, incluindo a boca, estômago e pulmões. *P. fluorescens* são geralmente consideradas não patogênicas para os seres humanos. No entanto, apesar de serem menos virulentas do que *P. aeruginosa*, elas podem provocar infecções agudas de caráter oportunista, sendo o local mais comum de infecção a corrente sanguínea (Scales et al., 2014; Nishimura et al., 2017).

Esta espécie secreta um pigmento fluorescente verde-amarelo que é o sideróforo pioverdina, também chamado de fluoresceína e que confere sua fluorescência quando exposto a luz UV (Muller et al., 2016). A pioverdina é o principal sideróforo produzido, é um composto de alta-afinidade pelo ferro, importante para o crescimento bacteriano e sua sobrevivência. Algumas cepas de *P. fluorescens* produzem também outros sideróforos secundários; *P. fluorescens* ATCC 17400 produz quinolobactina, pseudomonina, acinetobactina e anguibactina (Scales et al., 2014). Seis classes de metabólitos secundários já foram descritos por inibir crescimento de fungos e bactérias produzidos em parte por *P. fluorescens*, sendo eles as fenazinas, florglucinóis, pioluteorina, pirrolnitrina, lipopeptídeos cíclicos e cianeto de hidrogênio (Muller et al., 2016).

Sua capacidade extremamente versátil permite que esta bactéria possa persistir em uma ampla gama de ambientes fora de um hospedeiro. Estes incluem solo, superfícies de plantas, equipamentos não estéreis, superfícies de paredes e até mesmo em seus interiores (Scales et al., 2014; Rossi et al., 2016).

A membrana externa de *P. fluorescens* pode variar a sua permeabilidade em função da temperatura de crescimento, mesmo que nenhuma diferença na composição seja encontrada para correlacionar com esta transição. O efeito foi atribuído a uma mudança na estrutura das porinas que afeta a sua função, uma vez que uma diminuição na temperatura de crescimento induz uma redução no componente OprF (porina F), sugerindo uma mudança estrutural. Isto poderá se refletir em sua habilidade de crescer em baixas temperaturas (Arana et al., 2010; Magro et al., 2016).

Outra característica importante das *P. fluorescens* é sua capacidade de adesão e formação de biofilmes (Rossi et al., 2016). A formação de biofilme em superfícies, como as utilizadas para produção de alimentos, vem sendo cada vez mais estudada, pois os biofilmes agem como pontos de contaminação, liberando assim células de micro-organismos patogênicos, oportunistas ou deterioradores, comprometendo a qualidade dessas matérias-primas e seus futuros derivados (Cleto et al., 2012; Marchand et al., 2012).

3.4 Biofilmes microbianos

Biofilmes são comunidades microbianas, sendo uma forma natural de crescimento de muitos micro-organismos. Adesão de células microbianas, subsequente formação de biofilme e maturação dessas estruturas são conectadas com mudanças fenotípicas nas células, com manifestações geralmente de novas vias metabólicas de melhora na resistência a compostos tóxicos. Para algumas bactérias patogênicas, isto reflete em um aumento na virulência (Masák et al., 2014).

A formação de biofilme se divide em quatro fases principais: adesão, produção de exopolissacarídeos (EPS), maturação e desprendimento das células do biofilme, que poderá gerar um novo biofilme. A etapa de adesão de células livres, conhecidas como planctônicas irá se iniciar pelo acúmulo de material orgânico e inorgânico sobre uma superfície onde poderão desenvolver-se aglomerados bacterianos. Essa adesão inicial ainda é capaz de ser removida. Essa interação poderá torna-se mais forte conforme se inicia a produção de uma matriz de EPS onde essa etapa da formação do biofilme acaba se tornando irreversível. Após a maturação de um biofilme, estes micro-

organismos se tornam mais resistentes e protegidos da pressão do ambiente e da ação de sanificantes e antimicrobianos. Os mecanismos de dispersão de um biofilme podem ser divididos em dois tipos, a dispersão ativa e passiva. A ativa refere-se a mecanismos que são iniciados pelas próprias bactérias, enquanto que a passiva refere-se a separação celular mediada por forças externas. Então para que se possa permitir a ação desses agentes sanificantes será necessária a aplicação de uma força mecânica que seja capaz de romper sua estrutura (Seca 2015; Abdullahi et al., 2016).

Os biofilmes produzidos no meio ambiente geralmente consistem em estruturas formadas por mais do que uma espécie ou sub-espécie, tornando-se comunidades microbianas altamente complexas. As estruturas extracelulares de tais biofilmes multi-espécies podem diferir do modelo de mono-espécies até pelo fornecimento de substratos para processos catabólicos provenientes de outros micro-organismos, enfatizando a importância de se estudar melhor estas comunidades complexas (Welch et al., 2012; Roder et al., 2016).

Geralmente os biofilmes são criados de forma não aleatória e distribuídos por microcolônias de células bacterianas e estes estão embebidos por uma matriz modelada ou glicocálice, onde as substâncias poliméricas extracelulares (exopolissacarídeos) vão constituir de 75-80% do volume. Os EPS são compostos de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, entre outros compostos, e sua produção é o principal evento durante o desenvolvimento de um biofilme (Murugan et al., 2016).

Um dos grandes responsáveis por conferir a proteção, tornando as células fortemente aderidas (essas denominadas sésseis) mais resistentes, é essa matriz de EPS, que agirá como uma barreira física, impedindo que os agentes sanificantes cheguem a seus sítios de ação (Welch et al., 2012). Em comparação com as células planctônicas, as bactérias presentes em um biofilme podem se tornar até 1000 vezes mais resistentes (Quilès et al., 2016).

O EPS irá determinar as propriedades físicas do biofilme, enquanto as células bacterianas irão determinar suas propriedades fisiológicas. O EPS irá desempenhar um papel importante na fixação, desprendimento, resistência mecânica, resistência a predadores, desidratação, interações entre subpopulações, tolerância e troca de material genético, desempenhando um

papel não apenas na sua formação, mas também no seu comportamento (Murugan et al., 2016).

A remoção de biofilme na indústria acaba se tornando difícil, devido a presença de exopolissacarídeo secretado pelos micro-organismos diminuindo a eficácia da limpeza de equipamento complexos de processamento (Marchand et al., 2012).

Os gêneros bacterianos que apresentam maior capacidade de formação de biofilmes são *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium* e *Escherichia coli* (Seco 2015).

Entre as *Pseudomonas* sp. isoladas de leite cru, as *Pseudomonas fluorescens* são as mais frequentemente encontradas (Martins et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Puga, Orgaz e SanJose, 2016; Rossi et al., 2016; Nishimura et al., 2017; Xu et al., 2017).

A capacidade de aderir a superfícies sólidas e a consecutiva formação de uma organizada comunidade bacteriana são passos importantes no estabelecimento de biofilmes. Sabe-se que a mudança do modo de crescimento planctônico para biofilme é um processo que ocorre em resposta a mudanças nas condições ambientais (Cleto et al., 2012). Em um estudo realizado por Rossi et al. (2016), observou-se que a maioria das cepas de *P. fluorescens* isoladas de fábricas de laticínios, foram capazes de formar biofilme a 10 °C após 48 horas. Foi suposto também que a formação de biofilmes é aumentada pela motilidade celular, particularmente quando mediada por flagelos. A transição entre o estado planctônico para o estado sésil é muitas vezes descrita como um ciclo de eventos regulados que permitem que as populações bacterianas se adaptem ao crescimento a uma determinada superfície (Gallique et al., 2017). Essa transição é acompanhada por mudanças na função flagelar, produção de pili do tipo IV (T4P), acúmulo intracelular do segundo mensageiro diglanilato cíclico (c-di-GMP), produção de adesinas e exopolissacarídeos que contribuem para a formação de uma comunidade organizada de biofilme (Kazmierczak, Schniederberend e Jain, 2015; Gallique et al., 2017).

A formação de biofilmes em superfícies, como o aço inoxidável, utilizados para produção de alimentos, vem sendo cada vez mais estudada,

pois a limpeza química após o uso deve ser aplicada adequadamente nos equipamentos e superfícies alimentares. No entanto, esta operação, quando não executada devidamente, pode eliminar apenas parte dos micro-organismos deixando outros aderidos a superfície. Isso acarretará como pontos de contaminação, liberando assim células de micro-organismos patogênicos, oportunistas ou deterioradores contidos no biofilme, comprometendo a qualidade da matéria-prima e seus futuros derivados (Cleto et al., 2012, Marchand et al., 2012).

Atualmente os biofilmes formados por *P. fluorescens* em leite são pouco abordados, mesmo esse micro-organismo sendo frequentemente isolado dessa matéria prima (Scatamburlo et al., 2015; Lin et al., 2016; Rossi et al., 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.1 Isolados bacterianos e condições de cultivo

Duas cepas de *Pseudomonas fluorescens* foram utilizados neste estudo. Ambos foram obtidos no período de 2012 a 2013 e identificados em trabalho anterior como *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 com o código MH046417 e *Pseudomonas fluorescens* PL7.1 com o código MH046418 no *Standard Nucleotide BLAST* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As duas cepas demonstraram pelo menos 98% de correspondência com as sequências disponíveis no banco de dados. Essas cepas foram provenientes de amostras de leite cru de búfala refrigerado, obtidas de um tanque de resfriamento de uma indústria de laticínios localizada no município de Glorinha – RS. Os mesmos foram congelados em *skim milk* e mantidos a -20 °C. As cepas foram descongeladas e semeadas em 3 mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) e incubados a temperatura de 30 °C por 48 horas. Após seu crescimento foram estriados por esgotamento em placas *Trypticase Soy Agar* (TSA) e incubados a 30 °C por 48 horas.

4.2 Confirmação da identificação das cepas bacterianas via MALDI-TOF/MS

A confirmação das cepas de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 e PL7.1 foram realizadas por MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). A partir do crescimento em TSA, uma colônia de cada cepa foi adicionada a microtubos de centrifugação contendo 300 µL de água Milli-Q. Estes microtubos foram homogeneizados por vórtex e adicionados de 900 µL de etanol. A seguir os microtubos foram centrifugados duas vezes a velocidade de ≥ 13.000 rpm, durante 2 min. Foi retirada a fração do álcool e o complexo etanol-pellet foi deixado secar a temperatura ambiente, durante dois a três minutos. Ácido

fórmico 70% (25 µL) foi adicionado ao sedimento e homogeneizado por vórtex. Em seguida foi adicionado acetonitrila pura (25 µL) e misturados novamente por vórtex. Os microtubos foram centrifugados durante 2 min à velocidade \geq 13.000 rpm, de tal forma que todo o material fosse recolhido num pellet. Por fim, foram adicionados 1 µL de sobrenadante e 1 µL de solução ácido α -4-ciano-hidroxicinâmico (HCCA) sobre uma placa MALDI e deixado secar completamente à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em um aparelho MALDI Biotyper 4.0, software MBT OC.

4.3 Avaliação de atividade proteolítica em ágar leite

A atividade proteolítica foi avaliada conforme Ruaro et al. (2013) com algumas modificações. As cepas de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 e PL7.1 foram inoculadas em ágar leite (5 g/l de peptona de carne, 3 g/L de extrato de levedura, 12 g/L de ágar, 10% de leite UHT desnatado) por picada e incubados a 30 °C por 48 horas. Foi feita a verificação da presença de halo de proteólise ao redor da colônia a qual foi medido e expresso em milímetros (mm). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi usada como controle positivo.

4.4 Teste de suscetibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos

A suscetibilidade a agentes antimicrobianos foi testada usando o método de difusão em disco de acordo com as orientações do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2017). As cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 e o controle *P. fluorescens* NCTC 10038 foram inoculados em solução salina a 0,85% e ajustados para 0,5 da escala de McFarland. Em seguida foram semeados em placas de ágar Mueller-Hinton (Himedia, Índia). Após foram adicionados 12 diferentes discos de antibiótico (Sensifar, Cefar). As classes dos discos de antibiótico utilizadas foram de β -lactâmicos (Piperacilina-tazobactam 110 µg), cefalosporinas (Ceftazidima 30 µg, Cefepima 30 µg), monobactâmicos (Aztreonama 30 µg), carbapenêmicos (Imipenem 10 µg, Meropenem 10 µg), aminoglicosídeos (Gentamicina 10 µg, Trobamicina 10 µg, Amicacina 30 µg) e fluoroquinolonas (Ciprofloxacina 5 µg). As placas de *P. fluorescens* PL5.4, PL7.1 e *P. fluorescens* NCTC 10038 foram incubadas a 30 °C. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em

milímetros e a partir deste resultado classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes.

4.5 Investigação da produção de exopolissacarídeos (EPS) por meio sólido contendo Calcofluor

Para o ensaio de EPS as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 foram crescidas em meio sintético (K_2HPO_4 0,6 g/L; KH_2PO_4 1,8 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L; NaCl 0,1 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,2 g/L; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2,4 mg/L; H_3BO_3 2,8 mg/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,08 mg/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,24 mg/L; suplementado com 4 mL de FeEDTA 1,64%; 1 mL de biotina 100 µg/mL; manitol 5,0 g/L; L-glutamato monossódico monohidratado 1,87 g/L) acrescido do corante epifluorescente Calcofluor na concentração final de 200 µg/mL. As placas foram divididas em quadrantes e estriadas as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1, e os controles *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *P. fluorescens* NCTC 10038. Após 24 horas de crescimento em estufa à 30 °C, a detecção da produção de exopolissarídeo (EPS) de cada cepa foi determinada com a iluminação das placas por uma lâmpada *long wave ultraviolet* (LW UV-A) Xelux® com comprimento de onda de 365 nm (Serrato et al., 2006).

4.6 Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Twitching

O ensaio associado a motilidade do tipo Twitching está relacionado a movimentos repetitivos de extensão e retração das estruturas pili tipo IV que é observado em superfícies sólidas, interfaces ou em meios com viscosidades moderadas (1% de ágar). As cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 foram submetidas ao ensaio de Twitching onde foram inoculados por picada no ágar Luria-Bertani (LB) 1% até o fundo da placa. Após incubação a 30 °C durante 24 horas removeu-se o ágar e determinou-se a zona de motilidade em mm por coloração da placa de Petri com cristal violeta a 2% durante 2 horas. Cada cepa foi testada em quadruplicata. Foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controle positivo (Otton et al., 2017).

4.7 Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Swarming

O ensaio associado a motilidade do tipo Swarming, avalia um padrão dendrítico de movimento e é observada na presença de fontes específicas de nitrogênio e carbono, bem como em superfícies menos viscosas, como 0,4-0,7% de ágar. O ensaio foi realizado de acordo com Otton et al. (2017) com algumas adaptações. Para o ensaio foi utilizado o ágar Luria Bertani 0,5% suplementado com 12 mM de glicose e 12 mM de glutamato. As placas foram secas durante 1 hora sob fluxo laminar e após esta secagem as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 foram inoculadas por picada no ágar até o fundo da placa. A incubação foi realizada em atmosfera úmida a 30 °C durante 24 horas e à temperatura ambiente durante mais 48 horas. Após o período de incubação, mediu-se a zona de motilidade em mm. Placas de TSA inoculadas com as cepas foram utilizadas como controle negativo. Cada cepa foi testada em duplicata. Foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controle positivo. A positividade do teste baseou-se em 80% da diferença do tamanho do halo do teste em LB 0,5% em relação a inoculação no meio TSA.

4.8 Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme

Para a formação de biofilme foi utilizado o método descrito por Stepanovic et al. (2000). Após o crescimento bacteriano das cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 em placas de TSA, suas colônias foram ressuspensas em 3 mL de solução salina a 0,85% e a turbidez padronizada de acordo com a escala de McFarland de 0,5, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços de material poliestireno com fundo chato (NEST, China). As cepas foram inoculadas individualmente em octoplicatas. Aos poços foram adicionados 180 µL de TSB (Himedia, Índia) acrescido de 0,25% de glicose e 20 µL de suspensão bacteriana de cada uma das cepas individualmente. Para os poços com o controle negativo (c-) foram tratados nas mesmas condições, mas sem a presença das cepas. Para o controle positivo foi usada uma cultura forte formadora de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Moura et al., 2015). Três repetições foram usadas para as incubações em diferentes

condições: 7 ° C durante 72 horas, 23 ° C durante 24 horas e a 37 ° C durante 24 horas. Após a incubação, os poços foram aspirados e as amostras lavadas três vezes com 200 µL de solução salina a 0,85%. A fixação das bactérias foi realizada usando 200 µL de metanol (PA) durante 20 min. Depois o metanol foi aspirado e as microplacas invertidas, deixando secar durante a noite à temperatura ambiente.

O procedimento de coloração foi realizado com 200 µL de uma solução de cristal de violeta a 0,5% durante 15 min, seguido por lavagem das placas com água destilada estéril. Após a secagem das placas, as células bacterianas fixadas e coradas no fundo das cavidades foram ressuspensas em 200 µL de etanol a 95% durante 30 min e depois a quantificação do biofilme foi feita. A densidade óptica (DO) do biofilme bacteriano foi quantificada com a ajuda de um espectrofotômetro leitor de microplacas a um comprimento de onda de 570 nm (Anthos 2010 Tipo 17 550 S. Nº 17 550 4894). Todos os micro-organismos foram separados em categorias usando a DO dos biofilmes bacterianos. As amostras foram classificadas como: não formador de biofilme ($DO_{\text{biofilme}} < DO_{\text{c-}}$), fraco formador de biofilme ($DO_{\text{c-}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 2 \times DO_{\text{c-}}$), moderado formador de biofilme ($2 \times DO_{\text{c-}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 4 \times DO_{\text{c-}}$) e forte formador de biofilme ($4 \times DO_{\text{c-}} < DO_{\text{biofilme}}$).

4.9 Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme com leite residual

Para simular a presença de leite numa superfície, as placas de microtitulações tiveram os poços preenchidos com 200 µL de leite bovino UHT desnatado por duas horas a temperatura ambiente e a seguir aspirados. O procedimento de formação, leitura e interpretação do biofilme foi feito igualmente ao item 4.8.

4.10 Efeitos da co-cultura de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 no biofilme de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4

Para avaliar o efeito do co-cultivo de *L. monocytogenes* ATCC 7644 sobre a formação de biofilme da cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4, as colônias destas cepas, previamente cultivados em TSA, foram ressuspensas

em 0,85% de solução salina e a turbidez padronizada de acordo com a escala de McFarland de 0.5, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Foram acrescentados 10 μ L de cada suspensão bacteriana em placas de microtitulação de 96 poços de material poliestireno com fundo chato (NEST, China) e seguido o mesmo protocolo descrito por Stepanovic et al. (2000). Três repetições foram usadas para avaliar a formação de biofilmes em diferentes condições: 7 °C durante 72 horas, 23 °C durante 24 horas e a 37 °C durante 24 horas.

4.11 Avaliação da formação de biofilme da cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 em superfícies de aço inoxidável

Foi avaliada a capacidade de formação de biofilme pela cepa de *P. fluorescens* PL5.4 em corpos de prova de aço inoxidável American Iron and Steel Institute - AISI 304 (1 cm x 1 cm, espessura desprezível) de acordo com a metodologia descrita por Nörnberg et al. (2011) e Bayoumi et al. (2012) com algumas modificações. Para a higienização dos corpos de prova de aço inoxidável, foi feita a sua imersão em acetona durante 30 min para remover gordura ou impressões digitais, em seguida foi feita lavagem com água destilada estéril (dH₂O) e submetidos a esterilização em autoclave. Para o experimento, as colônias bacterianas foram crescidas em TSA por 24 horas à 30 °C. As mesmas foram transferidas para meio de cultura TSB e incubadas por 24 horas a 30 °C. Uma alíquota de 2 mL na concentração de 10^8 UFC/mL (ajustada em espectrofotômetro com densidade óptica de 600 nm), foi transferida para frascos Erlenmeyers contendo 18 mL de TSB acrescido de 0,25% de glicose. Para cada Erlenmeyer três corpos de prova de aço inoxidável foram adicionados. Os mesmos foram posteriormente incubados sem agitação a 7 °C, 23 °C e 30 °C durante 24, 48, e 72 horas. A cada 24 horas um corpo de prova de cada Erlenmeyer foi assepticamente removido usando uma pinça estéril, lavando três vezes em dH₂O estéril para remover células fracamente aderentes. Os corpos de prova contendo células de biofilme foram imersos em 10 mL de solução salina 0,85% e submetidos a banho por ultrassom Unique modelo USC700 com uma frequência de 40 kHz, e tratados por um período de 10 min a fim de liberar células do biofilme. Diluições decimais foram feitas a partir de cada solução contendo o corpo de prova. A

seguir foram plaqueadas e incubadas a 30 °C durante 24 horas. Foram realizadas contagens para determinar o número de células sésseis expressas em log UFC/cm². Todas as contagens foram realizadas em duplicata. Para o controle de crescimento das bactérias também foram feitas contagem das células livres (planctônicas) contidas no erlemeyer. Para o controle positivo foi usada uma cultura formadora de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Moura et al., 2015).

4.12 Avaliação da formação de biofilme da cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 em superfícies de aço inoxidável com leite residual

Para simular a presença de leite numa superfície de aço inoxidável, foram adicionados 2 mL de leite bovino UHT desnatado em Erlenmeyers contendo 16 mL de caldo TSB antes do ensaio de formação de biofilme. O procedimento de formação de biofilme e interpretação foi realizado de acordo com o item 4.11.

4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura

A formação de biofilme pela cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 sobre um corpo de prova de aço inoxidável (1 cm x 1 cm, espessura desprezível) e a suas células planctônicas foram examinadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para esta análise, foi utilizado um frasco Erlenmeyer com 18 mL do meio de cultura caldo TSB acrescido de 0,25 % de glicose. A esse Erlenmeyer foram adicionados 2 mL de um pré-inóculo contendo a cepa de *P. fluorescens* PL5.4, com concentração em torno de 10⁸ UFC/mL.

A higienização do corpo de prova foi realizada por sua imersão em acetona durante 30 min para remover gordura ou impressões digitais, em seguida foi feita lavagem com água estéril destilada (dH₂O) e submetidos a esterilização em autoclave. Após, o mesmo foi imerso no caldo contendo a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 e incubado a 30 °C por 24 horas. Após esse período, para a verificação de células sésseis, a superfície com as células

aderidas, foi fixada com 1 mL glutaraldeído 3% (v/v) em tampão fosfato 0,2 M pH 7.2 por 3 dias. Para a verificação das células livres (planctônicas), foi retirado 1 mL do caldo inoculado e adicionado a um tubo de microcentrifuga, o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min para a obtenção do pellet com as células. Deste foi retirado o sobrenadante e adicionado 1 mL glutaraldeído 3% (v/v) em tampão fosfato 0,2 M pH 7.2 por 3 dias, para fixação do mesmo.

Após este processo, os materiais foram lavados três vezes com o mesmo tampão e desidratados num gradiente de acetona de 30% a 100% de concentração (v/v). A seguir, o material foi processado em um secador de ponto crítico (Balzers CPD030; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Na sequência, partículas de ouro e platina foram depositadas sobre as amostras. A visualização foi realizada através de um Microscópio Eletrônico de Varredura JSM6060 (JEOL, Tóquio, Japão).

4.14 Análise estatística

Os valores das contagens foram convertidos em logaritmos decimais ($\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ e $\log \text{UFC}/\text{mL}$) para corresponder a uma distribuição normal. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) via modelos lineares generalizados do programa SPSS, versão 18, seguida do teste de Bonferroni para avaliar as diferenças significativas, considerando o valor de $p < 0,05$ aceito para indicar diferenças significativas.

5. RESULTADOS

5.1 Confirmação da identificação das cepas bacterianas via MALDI-TOF/MS

A análise via MALDI-TOF/MS foi capaz de identificar ambos as cepas como *Pseudomonas fluorescens*. Foram obtidos scores de 1.863 para a cepa PL5.4 e 1.996 para a cepa PL7.1. Esses valores de scores de identificação representam um nível de confiança atribuído apenas para gênero, segundo tabela 1.

Tabela 1. Scores para a identificação de bactérias via MALDI-TOF/MS

Scores	Descrição	Símbolo
2.300 – 3.000	Identificação segura a nível de espécie	+++
2.000 – 2.299	Identificação segura a nível de gênero Provável identificação a nível de espécie	++
1.700 – 1.999	Provável identificação a nível de gênero	+
0 – 1.699	Nível de confiança insuficiente para identificação	-

5.2 Avaliação de atividade proteolítica em ágar leite

Neste teste, foi possível observar uma área de degradação ao redor do crescimento das colônias das duas cepas, indicando a atividade proteolítica no meio de cultura ágar leite. Os halos medidos para a cepa de *P. fluorescens* PL7.1 variou de 10 a 16 mm, já os halos medidos para a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 variou de 11 a 15 mm. Ambas foram superiores aos halos produzidos pelo controle positivo, o qual variou de 5 a 8 mm.

5.3 Teste de sensibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos

De acordo com a interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, foi possível observar que as duas cepas de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 e PL71 apresentaram resistência a Aztreonam. A cepa de *P. fluorescens* PL5.4 apresentou resistência para Imipenem e sensível para os

demais antibióticos testados. A cepa de *P. fluorescens* PL7.1 apresentou um perfil de resistência para 3 classes de antibióticos, sendo resistente para Ceftazidima, Cefepima e Aztreonam. Demais resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 e PL7.1

Antibiótico	<i>P. fluorescens</i> NCTC					
	10038		PL5.4		PL7.1	
	halo (mm)	Result.	halo (mm)	Result.	halo (mm)	Result.
Piperacilina-						
tazobactam	33	S	30	S	30	S
Ceftazidima	24	S	25	S	6	R
Cefepima	6	R	22	S	7	R
Aztreonama	9	R	11	R	14	R
Imipenem	19	I	16	R	22	S
Meropenem	24	S	26	S	26	S
Gentamicina 10	27	S	26	S	26	S
Tobramicina	28	S	23	S	30	S
Amicacina	24	S	29	S	35	S
Ciprofloxacina	35	S	34	S	40	S

S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente.

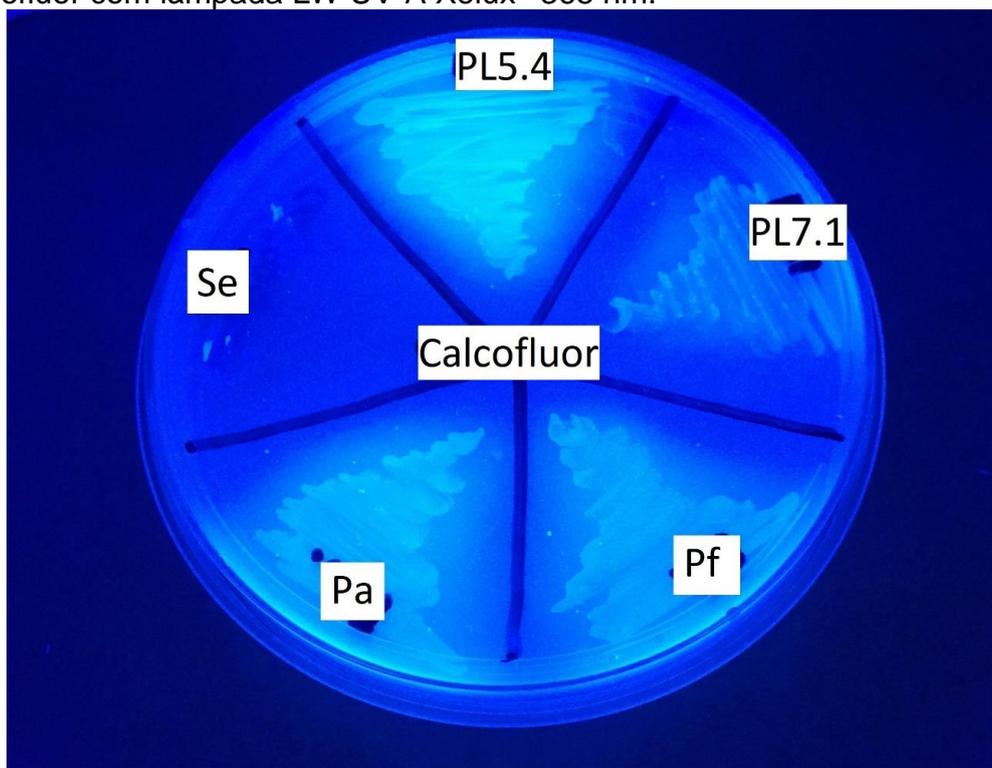
5.4 Investigação de produção de exopolissacarídeo (EPS) por meio sólido contendo Calcofluor

Na avaliação da produção de exopolissacarídeo as bactérias *Pseudomonas fluorescens* PL5.4, *Pseudomonas fluorescens* NCTC 10038 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 apresentaram fluorescência quando expostas a luz UV com comprimento de onda de 365 nm. A cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL7.1 não apresentou fluorescência quando comparado as demais bactérias testadas. A cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 não apresentou crescimento neste meio de cultura (Tabela 3). A fluorescência apresentada no meio contendo Calcofluor é indicativa da produção de EPS pelas bactérias (Figura 1).

Tabela 3. Presença e ausência da fluorescência das cepas testadas em meio Calcofluor expostas a luz UV.

Cepas	Resultado
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Presença de fluorescência
<i>P. fluorescens</i> NCTC 10038	Presença de fluorescência
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	Ausência de crescimento
<i>P. fluorescens</i> PL5.4	Presença de fluorescência
<i>P. fluorescens</i> PL7.1	Ausência de fluorescência

Figura 1. Visualização da fluorescência das cepas de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 e PL7.1 e controles em meio de cultura com adição de Calcofluor com lâmpada LW UV-A Xelux® 365 nm.



Se – *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, Pf – *Pseudomonas fluorescens* NCTC 10038, Pa – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, PL5.4 – *Pseudomonas fluorescens* PL5.4, PL7.1 – *Pseudomonas fluorescens* PL7.1.

5.5 Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Twitching

Para o ensaio de Twitching não houve positividade para nenhum das

cepas testadas. Não foram apresentadas zonas de motilidade. A zona apresentada pelo controle positivo variou de 7 a 8 mm.

5.6 Avaliação da motilidade bacteriana pelo ensaio Swarming

Para o ensaio de Swarming a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 apresentou uma diferença de 80% no crescimento radial no ágar LB 0,5% quando comparado com o controle negativo em TSA, apresentando uma zona média de 21 mm em ágar LB 0,5% e 13 mm em TSA, sendo considerada positiva para o teste. A cepa de *P. fluorescens* PL7.1 não apresentou diferença em ambos os meios testados, sendo negativa para o teste. O controle positivo apresentou diferença de 100% no crescimento radial entre os meios testados.

5.7 Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme

Nas avaliações de formação de biofilme, observou-se que as cepas bacterianas apresentaram comportamento semelhante quando submetidos a diferentes temperaturas, diferindo apenas para a temperatura de 37 °C. Para ambas as cepas, a melhor condição para a formação do biofilme foi evidenciada na temperatura de 7 °C pelo período de 72 horas apresentando-se como fortes formadoras (DO > 4x controle negativo) sob estas condições. A 23 °C por 24 horas ambas se apresentaram como moderadas formadoras de biofilme. A temperatura de 37 °C a cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 apresentou-se como moderada formadora e a cepa de *P. fluorescens* PL7.1 como não formadora de biofilme. O *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, controle positivo apresentou-se como forte formador a 37 °C e a 23 °C e não formador a temperatura de 7 °C.

5.8 Ensaio do Cristal Violeta para avaliação da formação de biofilme com leite residual

Na presença de leite residual, houve uma diminuição na capacidade de formar biofilme por ambas as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1. Porém os mesmos mantiveram-se como fortes formadores de biofilme (DO > 4x controle negativo) a temperatura de 7 °C pelo período de 72 horas (Tabela 4). O *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, controle positivo, apresentou-se

como forte formador a 37 °C e a 23 °C e não formador a temperatura de 7 °C.

Tabela 4. Formação de biofilme das cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 nas temperaturas de 7 °C por 72 horas, 23 °C por 24 horas e 37 °C por 24 horas, com e sem leite residual.

Bactérias	Biofilme sem resíduo			Biofilme com leite residual		
	37 °C	23 °C	7 °C	37 °C	23 °C	7 °C
<i>P. fluorescens</i>						
PL5.4	MF	MF	FTF	NF	MF	FTF
<i>P. fluorescens</i>						
PL7.1	NF	MF	FTF	NF	MF	FTF

NF - não formador; MF - moderado formador; FTF - forte formador.

5.9 Efeitos do co-cultivo de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 sobre a formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4

Na presença da *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 manteve sua capacidade de formar biofilme. Na temperatura de 37 °C o co-cultivo apresentou-se como fraco formador, para a temperatura de 23 °C apresentou-se como fraco formador e a temperatura de 7 °C apresentou-se como forte formador de biofilme. A *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando avaliada isoladamente apresentou-se como fraca formadora de biofilme a 37 °C e não formadora de biofilme nas temperaturas de 7 °C e 23 °C. O *Staphylococcus epidermidis* controle positivo apresentou-se como forte formador a 37 °C e a 23 °C e não formador a temperatura de 7° C.

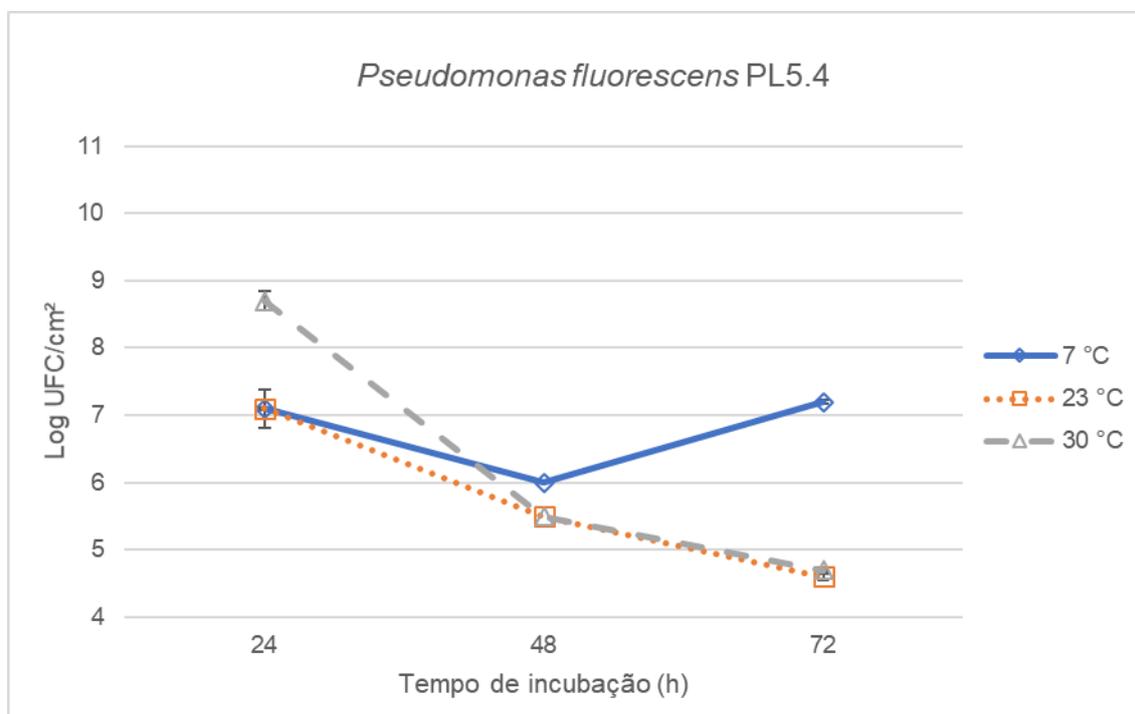
5.10 Avaliação da formação de biofilme da cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 em superfícies de aço inoxidável

Quando avaliadas as variações de temperatura para *P. fluorescens* PL5.4 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no número de células aderidas entre as temperaturas de 7 °C (variou de 6,0 a 7,0 log UFC/cm²) e 23 °C (variou de 5,0 a 7,0 log UFC/cm²). Porém foi observado um número de células aderidas significativamente maior ($p < 0,05$) para a temperatura de 30 °C (variou

de 5,0 a 8,0 log UFC/cm²).

Para as variações de tempo, *P. fluorescens* PL5.4 mostrou que no intervalo de 24-48 horas, na temperatura de 7 °C, houve uma queda significativa ($p < 0,05$) no número de células aderidas (variou de 7-6 log UFC/cm²). No intervalo de tempo de 48-72 horas houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de células aderidas ao aço inoxidável (variou de 6-7 log UFC/cm²). Na temperatura de 23 °C, no intervalo de tempo de 24-48 horas houve uma queda significativa ($p < 0,05$) de células aderidas ao aço inoxidável (variou de 7-5 log UFC/cm²) e no intervalo de 48-72 horas essa queda manteve-se em declínio (variou de 5-4 log UFC/cm²). A temperatura de 30 °C, conforme a variação de tempo, o comportamento da *P. fluorescens* PL5.4, manteve-se o mesmo descrito anteriormente para a temperatura de 23 °C (Figura 2).

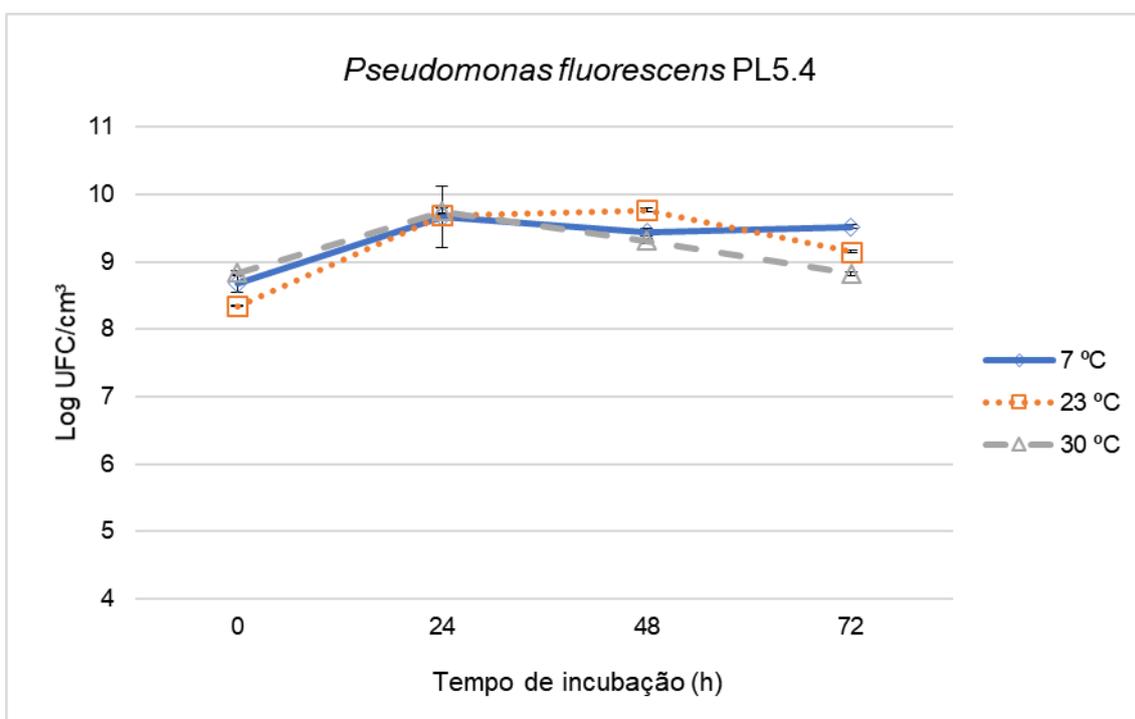
Figura 2. Contagem de células sésseis da cepa de *P. fluorescens* PL5.4 em superfície de aço inoxidável em meio de cultura TSB, nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperaturas de 7, 23 e 30 °C.



A contagem de células planctônicas para *P. fluorescens* PL5.4 no inóculo inicial (Tempo 0) foram obtidas médias de contagem de 8,5 log

UFC/cm³ para as três temperaturas testadas. O número médio de células planctônicas em 24 horas foi de 9,1 log UFC/cm³ para 7 °C e 9,7 log UFC/cm³ para 23 °C e 9,6 log UFC/cm² para 30 °C. O número médio de células planctônicas em 48 horas foi de 9,4 log UFC/cm³ para 7 °C e 9,7 log UFC/cm³ para 23 °C e 9,3 log UFC/cm³ para 30 °C. O número médio de células planctônicas em 72 horas foi de 9,5 log UFC/cm² para 7 °C e 9,1 log UFC/cm³ para 23 °C e 8,8 log UFC/cm³ para 30 °C (Figura 3).

Figura 3. Contagem de células planctônicas da cepa de *P. fluorescens* PL5.4 em meio de cultura TSB, nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperaturas de 7, 23 e 30 °C.



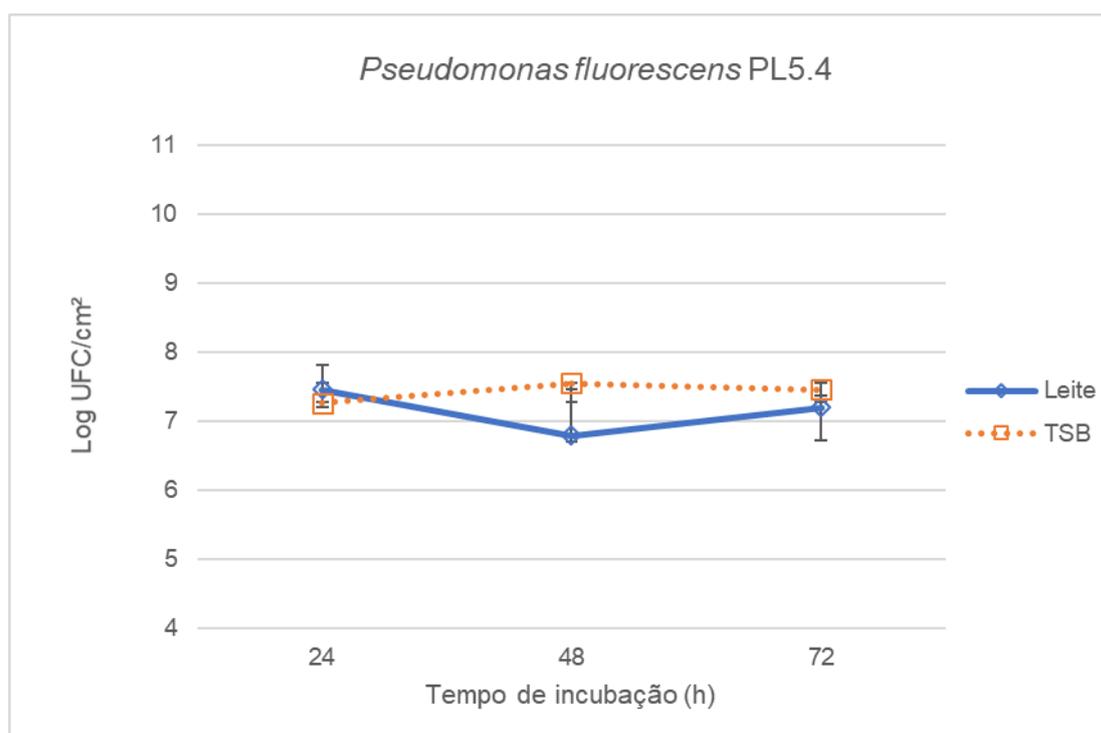
5.11 Avaliação da formação de biofilme da cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 em superfícies de aço inoxidável com leite residual

Para *P. fluorescens* PL5.4 testada, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no número de células aderidas ao aço inoxidável entre o caldo de TSB e o meio de TSB com leite residual. Também não houve diferença significativa ($p > 0,05$) conforme ocorreram as variações de tempo (24, 48 e 72 horas).

Quando avaliadas as variações de tempo para o caldo de TSB, o número médio de células aderidas a temperatura de 7 °C em 24 horas foi de 7,3 log UFC/cm². No tempo de 48 horas o número médio de células aderidas foi de 7,5 log UFC/cm². E no tempo de 72 horas foi de 7,4 log UFC/cm².

Para o caldo de TSB com leite residual, foi obtido número médio de células aderidas de 7,5 log UFC/cm² a temperatura de 7 °C em 24 horas. Para o tempo de 48 horas o número médio de células aderidas foi de 6,8 log UFC/cm². E para o tempo de 72 horas foi obtida contagem de 7,2 log UFC/cm². Ambos os resultados estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Contagem de células sésseis da cepa de *P. fluorescens* PL5.4 em superfície de aço inoxidável meio de cultura TSB e TSB com leite residual nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperatura de 7 °C.

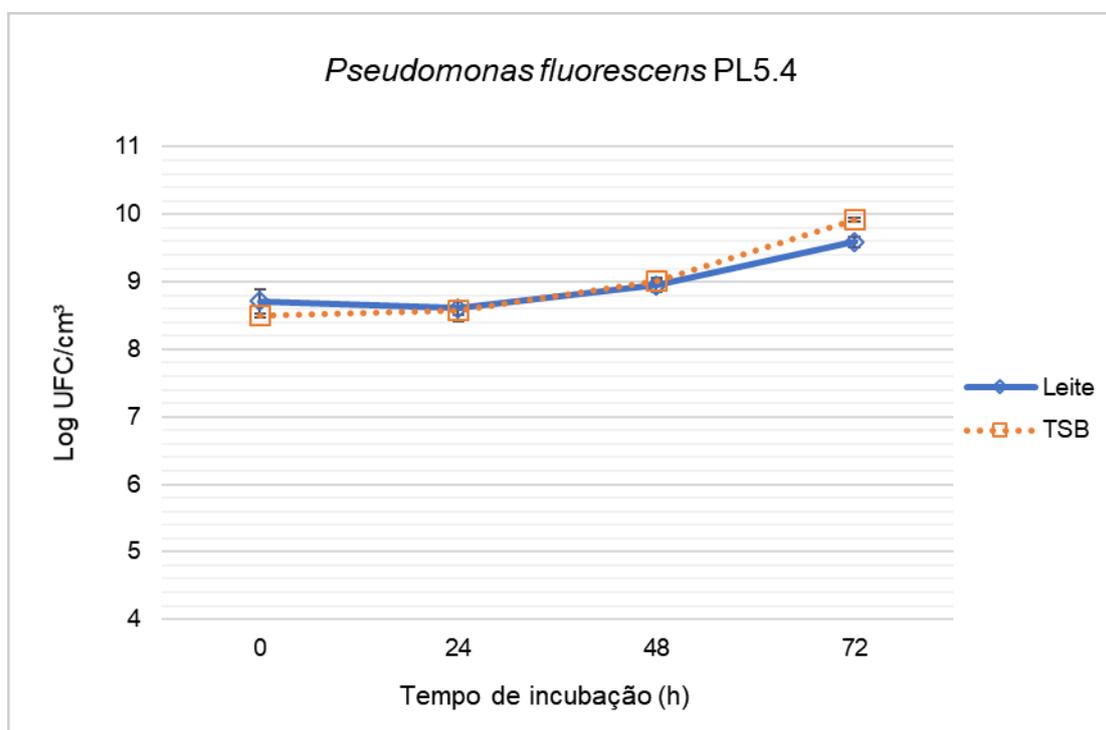


A temperatura de 7 °C, para a contagem de células planctônicas no inóculo inicial (Tempo 0) foram obtidas médias de contagem de 8,5 log UFC/cm³ para o caldo TSB e 8,7 log UFC/cm³ para o TSB com adição de leite residual.

O número médio de células planctônicas em 24 horas foi de 8,5 log

UFC/cm³ para o caldo TSB e 8,5 log UFC/cm³ para o TSB com leite. No tempo de 48 horas o número médio de células planctônicas foi de 9,0 log UFC/cm³ e 8,9 log UFC/cm³ para o TSB com leite. E no tempo de 72 horas foi de 9,9 log UFC/cm³ e 9,5 log UFC/cm³ para o TSB com leite. Ambos os resultados estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Contagem de células planctônicas da cepa de *P. fluorescens* PL5.4 em meio de cultura TSB e TSB com leite residual nos tempos de 24, 48 e 72 horas a temperatura de 7 °C.

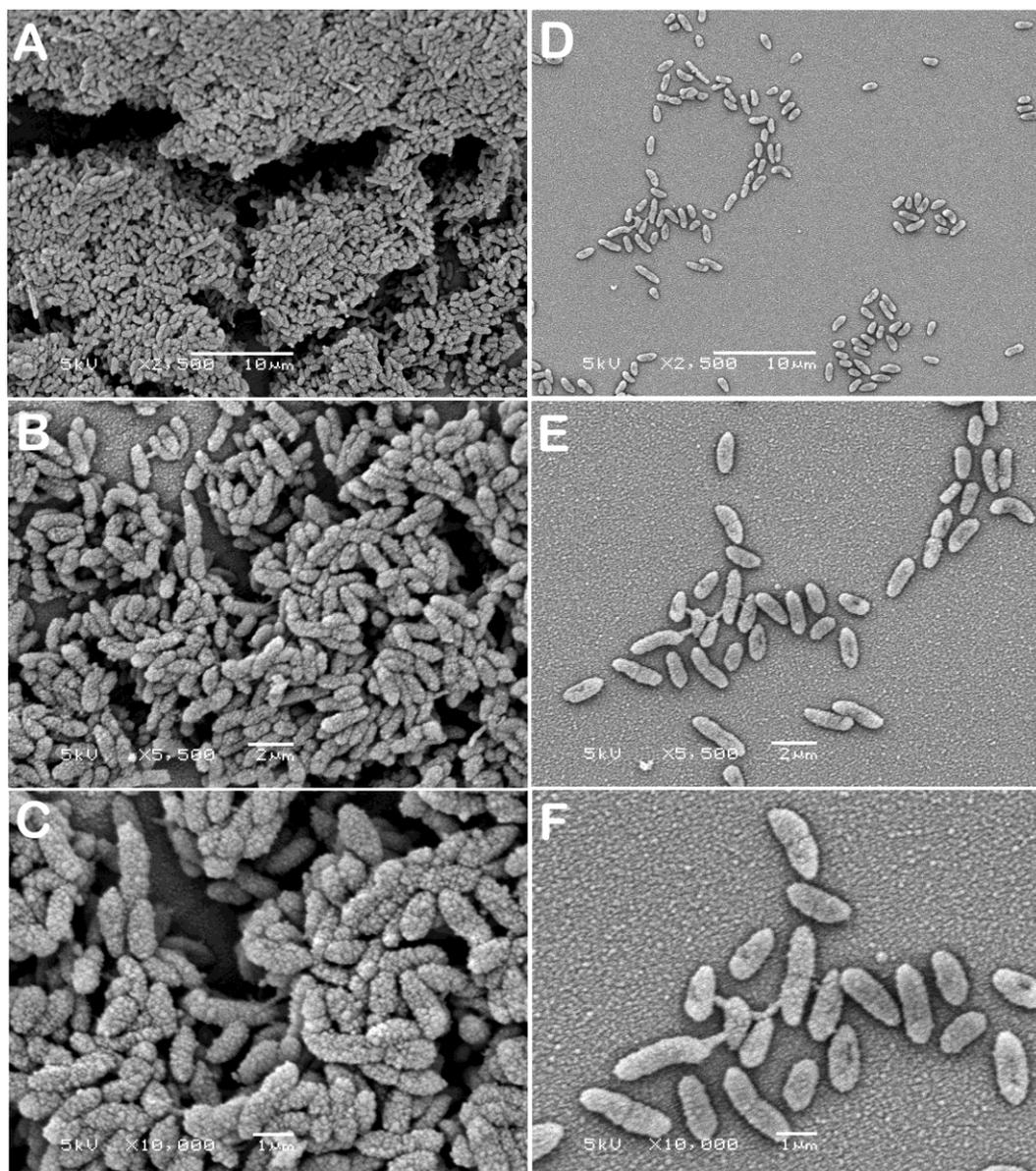


5.12 Microscopia Eletrônica de Varredura

A MEV permitiu visualizar a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 em seus dois estados, em forma séssil e em sua forma planctônica. As figuras 8 A, B e C demonstram as células aderidas ao cupom de aço inoxidável American Iron and Steel Institute - AISI 304, após 24 horas a temperatura de 30 °C em caldo TSB a 0,25% de glicose, em tamanhos de 2.500x, 5.500x e 10.000x respectivamente. Não foi possível observar a presença de EPS e estruturas de locomoção, embora esses micro-organismos tenham a capacidade de produzi-los. O comprimento das bactérias está em torno de 1 µm. A superfície celular

tem aparência rugosa. As figuras 8 D, E e F demonstram as células em sua forma planctônica cultivadas nas mesmas condições, estando as imagens captadas com os mesmos tamanhos anteriores, respectivamente. O comprimento das bactérias nessa forma planctônica encontra-se em torno de 2 μm . A superfície celular encontra-se mais lisa quando comparada com sua forma na condição de biofilme.

Figura 6. Eletromicrografias de varredura A, B e C da cepa de *P. fluorescens* PL5.4 aderida ao aço inoxidável AISI 304, após crescimento em TSB a 30 °C durante 24 horas. Eletromicrografias de varredura D, E e F da cepa de *P. fluorescens* PL5.4 em sua forma planctônica, após o crescimento em TSB a 30 °C durante 24 horas.



6. DISCUSSÃO

O gênero *Pseudomonas* spp. já é conhecido como responsável pela deterioração de leite e de muitos produtos lácteos (Arslan et al., 2011; Oliveira et al., 2015; Nucera et al., 2016). Embora diversos estudos relatem o

isolamento de *Pseudomonas* spp. de amostras de leite cru, *Pseudomonas fluorescens* é o grupo mais frequentemente envolvido nas alterações dos produtos derivados (Arslan et al., 2011; De Jonghe et al., 2011; Martins et al., 2014; Puga, Orgaz e SanJose, 2016; Rossi et al., 2016). Ainda existe uma escassez de estudos sobre a formação de biofilmes de *P. fluorescens* isoladas de leite (Rossi et al., 2016).

Os resultados da identificação das cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1, obtidos pelo MALDI-TOF/MS, foram consistentes com os achados anteriores via biologia molecular, apenas para a identificação a nível de gênero. Isso pode ter ocorrido, pois o MALDI-TOF/MS, atualmente é mais utilizado para identificação de isolados clínicos, devido a sua rapidez na identificação e maior disponibilidade de dados em sua biblioteca, comprometendo o poder discriminatório para amostras ambientais (Lo et al., 2017). Outro ponto a ser considerado, é a existência de um complexo no qual a *Pseudomonas fluorescens* está inserida, onde se contempla 52 espécies dentro deste grupo dificultando assim a sua identificação em nível de espécie (Scales et al., 2014; Garrido-Sanz et al., 2017).

Ambas as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 apresentaram alta capacidade proteolítica quando expostas ao meio de cultura acrescido de leite. Sabe-se que *Pseudomonas* spp. são capazes de produzir e secretar enzimas proteolíticas (Cleto et al., 2012; Martins et al., 2015). A produção dessas exoenzimas termorresistentes, como lipases e proteases por esses microrganismos, podem permanecer estáveis após o processo de pasteurização e por fim deteriorar o leite e seus futuros derivados (Boari et al., 2009; Bogo et al., 2017). Bogo et al. (2017), descreve que 21 bactérias psicotróficas isoladas em seu estudo apresentaram atividade proteolítica em ágar leite, sendo que 5 dessas enzimas produzidas mativeram sua atividade após tratamento térmico. Das 21 bactérias isoladas, 4 pertenciam ao gênero *Pseudomonas*. Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo também com Martins et al. (2015), onde descreve a produção de protease extracelular por *P. fluorescens*. Isso ressalta que, os processos de tratamento térmico e de refrigeração adotados pela indústria de laticínios durante o processamento e o armazenamento do leite não inibem completamente a atividade enzimática

(Boari et al., 2009; Cleto et al., 2012; Martins et al., 2015). Esse fato mostra a importância da produção e processamento do leite, dentro dos preceitos das boas práticas de fabricação para limitar sua contaminação e a alteração das suas propriedades organolépticas por bactérias contaminantes (Pinto et al., 2010; Martins et al., 2015, Nucera et al., 2016; Rossi et al., 2016).

A maioria das *Pseudomonas* spp. são naturalmente resistentes à penicilina e a maioria dos antibióticos β -lactâmicos (Arslan et al. 2011; Maravic' et al., 2012; Luczkiewicz, Kotlarska e Artichowicz, 2015). O presente estudo mostrou-se de acordo com a literatura, onde foi encontrada resistência de ambas as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 ao aztreonam, antibiótico da classe dos β -lactâmicos (Arslan et al. 2011; Maravic' et al., 2012; Decimo, Silveti e Brasca, 2016). Existe uma escassez de conhecimento relacionado ao perfil de susceptibilidade de *Pseudomonas fluorescens*, principalmente relacionado a área alimentar (Arslan et al., 2011; Ali et al., 2017). Em estudo realizado por Arslan et al., (2011), todas as *Pseudomonas* spp. isoladas de queijos foram resistentes a penicilina G, 28,1% eram resistentes a sulfametoxazol/trimetoprim, 6,2% eram resistentes a piperacilina/tazobactam (β -lactâmico) enquanto que não foi encontrada resistência à ceftazidima e outros β -lactâmicos. Para *P. fluorescens* em um trabalho publicado por Maravic' et al. (2012), foi encontrado um perfil de multi-resistência de 37% para as *P. fluorescens* isoladas de águas costeiras na Croácia. Foi também descrito pela primeira vez a identificação de uma cepa produtora de Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL - *Extended-Spectrum β -Lactamases*). O estudo relata que este mecanismo possivelmente foi adquirido através de uma transferência horizontal, tornando essa bactéria um potencial reservatório e vetor para a disseminação de resistência, visto que a *Pseudomonas fluorescens* possui notável adaptabilidade para variações ambientais (Maravic' et al., 2012).

Em estudo de Decimo, Silveti e Brasca (2016), relataram que uma proporção significativa de bactérias psicrotólicas apresentaram resistência a muitas classes funcionais de antibióticos e o nível de múltiplos traços de resistência aos antibióticos aumentaram ao longo da cadeia de transporte e armazenamento do leite cru. Os autores relataram que a resistência se tornou

comum entre bactérias psicrotróficas isoladas do leite e dos produtos lácteos e vem sendo aos poucos reconhecida como um problema público para os produtores, as indústrias e para os consumidores.

Para avaliar a capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS), foi realizado experimento de crescimento em placa acrescidos do corante Calcofluor. O Calcofluor trata-se de um corante fluorescente específico para polissacarídeos que contêm ligações β -1 \rightarrow 4 ou β -1 \rightarrow 3 (Serrato et al., 2006). As colônias que produziram EPS apresentaram fluorescência quando as placas foram expostas à luz UV (365nm). A cepa de *P. fluorescens* PL5.4 destaca-se pela alta intensidade de fluorescência quando comparado com a cepa de *P. fluorescens* PL7.1, que não apresentou fluorescência. Um biofilme formado implica em procedimentos de higienização mais rígidos, pois alguns sanitizantes não conseguem penetrar satisfatoriamente no EPS, que funciona como uma camada protetora para a célula bacteriana (Castro et al., 2017).

Pseudomonas sp. é uma bactéria móvel, que contém vários flagelos e um pili do tipo IV (Kazmierczak, Schniederberend e Jain, 2015; Yang et al., 2017). Este pili apresenta dois tipos de motilidade, o primeiro é referido como motilidade do tipo twitching, está associado a movimentos repetitivos de extensão e retração das estruturas do pili tipo IV, que é observado em superfícies sólidas ou com viscosidades moderadas (1% de ágar). A segunda forma de motilidade é a motilidade do tipo swarming, que tem um padrão dendrítico de movimento e é observada na presença de fontes específicas de nitrogênio e carbono, bem como em superfícies menos viscosas (0,4-0,7% de ágar) (Otton et al., 2017). A motilidade do tipo twitching é mediada apenas pelo pili do tipo IV, enquanto que motilidade do tipo swarming envolve o pili do tipo IV e uma classe de surfactantes segregadores conhecidos como ramnolípidios (Otton et al., 2017). Ramnolípidios produzidos durante o swarming e contribuem para a adesão e virulência (Lakshmanan, Nanda e Jeevaratnam, 2017). As motilidades do tipo twitching e swarming foram associadas no desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*, que se tornou um organismo modelo para a pesquisa de pili do tipo IV e biofilme (Otton et al., 2017).

A motilidade do tipo twitching é um movimento proveniente do pili tipo IV, pelo qual, bactérias podem aderir e formar biofilme sobre uma

superfície (Ribbe et al., 2017). O pili do tipo IV é controlado pelo *quorum sensing* em *P. aeruginosa*. Como um passo essencial para a adesão irreversível, ele pode afetar a morfologia e a estrutura do biofilme (Sun et al., 2017). Porém, ao contrário do que é encontrado para a espécie de *P. aeruginosa*, as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 não apresentaram a motilidade do tipo twitching. Como o pili do tipo IV são estruturas celulares únicas envolvidas nesse tipo de motilidade, é possível presumir que essa estrutura pode estar ausente ou incapaz de funcionar de forma correta. As razões para essa observação podem ser a ausência de genes responsáveis por formar as estruturas do pili, ou os genes embora presentes, não se expressem como o desejado, ou por fim os genes responsáveis estão presentes, mas em forma mutada (Otton et al., 2017).

Para o ensaio de motilidade do tipo swarming, apenas a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 foi positiva. A motilidade do tipo swarming é um fenômeno complexo que envolve vários fatores além de ramnolípidios, flagelos e a colaboração com o pili do tipo IV (Lakshmanan, Nanda e Jeevaratnam, 2017). Isso permite concluir que a cepa que não possui motilidade do tipo twitching, ainda pode apresentar motilidade do tipo swarming, onde essa motilidade está relacionada a presença de flagelos e outros fatores (Mastropaolo et al., 2012).

Estudos mostram que mutantes deficientes na motilidade swarming eram defeituosos na produção de lipopolissacarídeos, enquanto alguns eram deficientes na produção de sistemas de sinalização de c-di-GMP ou fatores que regulavam a diferenciação celular (Yang et al., 2017; Lakshmanan, Nanda e Jeevaratnam, 2017). A ausência da motilidade do tipo swarming na cepa de *P. fluorescens* PL7.1 pode ter sido mediada pela ausência dos fatores acima mencionados, incluindo diminuição da umidade superficial, diminuição da produção de exopolissacarídeos ou um defeito na síntese de proteínas de ligação.

Para que se possa ter uma compreensão maior sobre o impacto da motilidade na formação de biofilmes, é de extrema importância que sejam realizados testes para os genes relacionados ao pili tipo IV, nas cepas que apresentaram resultados negativos para os mesmos, e ainda assim, foram considerados fortes formadores de biofilme (Otton et al., 2017). Se a presença

desses genes for confirmada, então a possibilidade de que as condições sob as quais os testes de motilidade foram realizados, possam ter influenciado na expressão dos genes (Oliveira, Foster e Durham, 2016).

Os biofilmes destacam-se como um grave problema para a indústria de alimentos. Biofilmes bem estabelecidos são difíceis de remover das superfícies, tornando-se constante fonte de contaminação por bactérias contaminantes (Koo, Falsetta e Klein, 2013).

As cepas avaliadas neste estudo demonstraram que o tempo e a temperatura que a matéria prima fica exposta a superfícies, implicam diretamente sobre a formação de biofilmes. Observou-se que essas bactérias isoladas de leite de búfala, tiveram melhor capacidade de formar biofilmes, quando expostas a temperatura de 7 °C por um tempo de 72 horas. Para as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1, quanto maior o tempo de exposição, maior a concentração de células presentes no biofilme formado. Os resultados encontrados por Souza et al. (2014), Castro et al. (2017), mostraram formação de biofilme mais intensa à temperatura ideal (35-37 °C) do crescimento do *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. testados. Este achado pode ser explicado pelo fato de *Pseudomonas fluorescens* possuir uma característica psicrotrófica (Puga, Orgaz e San Jose, 2016). Mesmo tendo sua temperatura ótima de crescimento em torno de 28 °C, são capazes de se desenvolver em temperaturas empregadas na conservação de alimentos (7 °C à 10 °C) (De Jonghe et al., 2011; Oliveira et al., 2015). Desta forma, a refrigeração do leite cru, embora proporcione o controle de micro-organismos mesófilos indesejáveis, acaba por favorecer o desenvolvimento de psicrotróficos como *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria monocytogenes* (Boari et al., 2009; Pinto et al., 2010; Oliveira et al., 2015).

Outro aspecto a ser considerado no ambiente de processamento de leite é o desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos. Podendo diferentes espécies coexistirem em um biofilme microbiano, como exemplo a cultura de *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria monocytogenes* (Boari et al., 2009; Piercey, Hingston e Hansen, 2016; Puga, Orgaz e SanJose, 2016).

A *Listeria monocytogenes* é conhecida por ser um patógeno humano de origem alimentar (Piercey, Hingston e Hansen, 2016). *Listeria*

monocytogenes representa uma preocupação para a indústria de alimentos devido à gravidade das infecções de listeriose, onde a maioria das infecções é causada por alimentos não cozidos, como carne de porco, leite cru, salsichas ou peixes defumados. No entanto, outros alimentos foram descritos como veículos de *L. monocytogenes*, como saladas, alimentos vegetarianos não cozidos ou queijo produzidos por leite pasteurizado e não pasteurizado. *Listeria monocytogenes* é comumente encontrada em leite cru como parte de uma comunidade de mediadores de biofilme em tanques de refrigeração de leite (Weiler et al., 2013). No experimento de avaliação do co-cultivo da cepa de *P. fluorescens* PL5.4 com a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, foi demonstrado um desempenho superior da cepa *P. fluorescens* PL5.4 sobre a *L. monocytogenes* na formação de biofilme. O resultado da interação entre espécies em superfícies depende das condições (tempo, temperatura, nutrientes), das cepas envolvidas e dos respectivos tamanhos de sua população (Kives et al., 2005; Boari et al., 2009). Estudos relatam que, diferentes espécies de *Pseudomonas* spp. são mais prevalentes em indústrias de alimento do que cepas de *Listeria monocytogenes* (Martins et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Puga, Orgaz e SanJose, 2016; Rossi et al., 2016). Assim como relatado por Puga, Orgaz e SanJose (2016), foi observado uma relação comensal no biofilme entre as duas espécies, onde o colonizador primário (*P. fluorescens*) proporciona abrigo para fracos ou não formadores de biofilme. Quando este consórcio de dupla espécie desenvolve biofilmes sobre uma superfície sólida, aparentemente a interação entre as espécies, principalmente em temperaturas baixas, contribui para uma estrutura mais compacta do que a que foi construída pela *Listeria monocytogenes* em um biofilme em monocultivo (Puga, Orgaz e SanJose, 2016).

Em estudo realizado por Weiler et al. (2013), as cepas de *L. monocytogenes* adicionadas a um biofilme em co-cultivo estavam em menor número, pois os gêneros *Citrobacter* e *Lactococcus* dominavam a comunidade bacteriana do biofilme. Foi observado que quase todas as cepas de *L. monocytogenes* testadas são fracas formadoras de biofilme e provavelmente precisam de outros micro-organismos para iniciar a formação de um biofilme. Porém a incorporação de células de *L. monocytogenes* a um biofilme acaba se

tornando um foco de contaminação permanente da planta de processamento de leite e de produtos lácteos. Por fim o consumo de produtos lácteos contendo alto número de células de *L. monocytogenes* se torna uma fonte em potencial de infecções por listeriose humana (Weiler et al., 2013). Biofilmes multi-espécies têm atraído a atenção principalmente porque os seus constituintes podem resistir melhor a antimicrobianos do que biofilmes de espécies individuais (Boari et al., 2009; Weiler et al., 2013).

O material de poliestireno é menos utilizado na indústria do que o aço inoxidável. Este sim compõe tanques de resfriamentos, tubulações, tanques de transporte, superfícies e utensílios utilizados no processamento do leite (Picoli et al., 2017). No presente estudo foi possível observar que a cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4, em aço inoxidável, apresentou maior número na contagem de células na temperatura de 7 °C não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) entre o tempo de 24 a 72 horas. Isso demonstra a sua preferência por uma temperatura mais baixa e que o armazenamento prolongado pode manter essa estrutura. Visto que esta bactéria foi isolada de leite cru de búfala refrigerado, este estudo mostra que esta bactéria poderia formar biofilme em equipamentos compostos de aço inoxidável, na temperatura de 7 °C já com 24 horas, mantendo-se por até 72 horas de armazenamento.

Sabe-se que o leite cru pode permanecer por várias horas em tanques refrigerados até o início do processamento para a produção de seus derivados (Teixeira, Bastiano e Oliveira, 2005; Bernardes, 2014). Este período pode ser suficiente para o crescimento de micro-organismos com possível formação de biofilmes e comprometimento dessa matéria prima (Castro et al., 2017). A qualidade final dos produtos lácteos derivados pode ser altamente influenciada pela contaminação do leite cru, podendo causar degradação e redução de sua vida útil (Rossi et al., 2016; Pinto et al., 2017). O número de micro-organismos aderidos à superfície também é influenciado pela hidrofobicidade e carga da superfície, pois, superfícies hidrofóbicas, como o metal, apresentam número elevado de micro-organismos aderidos (Kasnowski et al., 2010; Souza et al., 2014). A presença de biofilme sobre o aço inoxidável está associada à produção de EPS por esses micro-organismos e também ao tempo de exposição da célula a superfície a ser aderida (Castro et al., 2017).

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura, foi possível observar, a cepa de *P. fluorescens* PL5.4 e comparar sua forma planctônica e sua forma séssil. Cada estado celular apresentou estruturas distintas. Sua forma séssil apresenta grandes aglomerados maciços de células compostos por muitas camadas. Porém não foi possível verificar a presença das estruturas de motilidade e a produção de EPS.

Simões et al. (2007), relata em seu estudo que biofilmes formados sob um fluxo turbulento foram mais metabolicamente ativos e tinham uma maior capacidade de produzir estruturas e proteínas da matriz quando comparado com biofilmes formados sob fluxo laminar. Esta caracterização detalhada do biofilme em resposta ao estresse também pode explicar a possível ausência dessas estruturas.

O resultado apresentado no presente estudo é derivado de um biofilme monoespécie, produzido em laboratório sob condições artificiais. A ausência de estruturas presentes nos biofilmes pode ser ocasionado pelo processo químico e físico que a amostra sofre durante o preparo para a visualização no MEV.

Biofilmes produzidos no ambiente geralmente consistem em mais de uma espécie, constituindo comunidades microbianas altamente complexas. Podendo diferir de modelos monoespécies, pois esses biofilmes apresentam substratos para processos catabólicos em outras espécies obtendo um alto grau de organização da matriz (Baum et al., 2009; Alavi e Hansen, 2013). O modelo monoespécie apresentado pode não ser representativo da realidade encontrada no meio ambiente.

Um estudo feito por Yoshioka e Newell (2016), mostrou que o diâmetro das células que crescem em um biofilme foi significativamente menor que o das células planctônicas, sugerindo que a mudança no estilo de vida de planctônico para biofilme torna o tamanho da célula menor. Eles relatam também que alterações metabólicas e de expressão gênica podem influenciar em mudanças no comportamento e estruturas de um biofilme. Esses achados são semelhantes com os encontrados no presente estudo, onde as células planctônicas apresentaram-se 1 µm maior que as células sésseis.

Numa indústria de alimentos é necessário que as superfícies onde se processam os alimentos sejam bem higienizadas para que não veiculem micro-organismos patogênicos e para que haja redução da carga microbiana de deteriorantes em níveis considerados seguros (Pinto et al., 2017). As fazendas leiteiras e indústrias de processamento de produtos lácteos podem apresentar práticas de higiene precárias, bem como treinamento limitado em segurança alimentar para os trabalhadores, o que passa a representar um perigo biológico ao ambiente de manipulação (Nucera et al., 2016). Os princípios dos sistemas de segurança alimentar com base na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (*Hazard Analysis and Critical Control Points* - HACCP) são necessários e recomendados para prevenir a contaminação do leite cru (Pinto et al., 2017).

O biofilme é produzido pelos micro-organismos como forma de sobrevivência em ambientes hostis, o que os torna mais resistentes a substâncias antimicrobianas e agentes sanificantes (Weiler et al., 2013; Martins et al., 2014; Oliveira et al., 2015). Por esse motivo são alvo de preocupação para indústrias de produtos alimentares. São constituídos por patógenos ou micro-organismos deteriorantes, podendo ocasionar doenças e prejuízos econômicos devido à depreciação do produto final através de alterações físico-químicas e sensoriais, requerendo maior atenção dos setores produtores de lacteos (Puga, Orgaz e SanJose, 2016; Rossi et al., 2016; Nishimura et al., 2017; Xu et al., 2017).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que as cepas de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 e PL7.1 são capazes de produzir biofilme nas diversas condições as quais foram expostas.

As duas cepas de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 e PL7.1 apresentaram resistência a Aztreonam. A cepa PL7.1 mostrou-se mais resistente aos antibióticos testados do que a cepa de PL5.4 Apresentando um perfil de resistência para 3 classes de antibióticos.

Foram avaliados fatores como produção de EPS e motilidade, os quais foram vistos que são ausentes ou fracamente produzidos pela cepa de *P. fluorescens* PL7.1 e produzidos em parte pela cepa de *P. fluorescens* PL5.4, demonstrando que a produção dos mesmos pode depender de condições como tempo, temperatura, estresse e disponibilidade de nutrientes.

A avaliação da formação de biofilme em material de poliestireno mostrou que as cepas de *P. fluorescens* PL5.4 e PL7.1 foram capazes de formar biofilme em temperaturas de 7 °C e 23 °C em meio de cultura de TSB e em meio de cultura com adição de leite, ressaltando que ambas se apresentaram como fortes formadores de biofilme a temperatura de 7 °C, temperatura essa a qual o leite é armazenado.

Ainda, a cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 foi capaz de crescer e formar biofilme em co-cultivo com a cultura de *Listeria monocytogenes* ATCC 7544, dessa forma, podendo coexistirem em biofilmes.

A cepa de *Pseudomonas fluorescens* PL5.4 foi capaz de aderir a corpos de prova de aço inoxidável e manter essa estrutura em temperatura de refrigeração pelo período de 72 horas.

O presente estudo foi capaz de observar o biofilme produzido pela cepa de *P. fluorescens* PL5.4 e sua forma plantônica, porém não foi possível observar demais estruturas como produção de EPS e estruturas de motilidade.

Destaca-se a importância da realização da avaliação da expressão gênica para genes relacionados ao pili tipo IV, flagelos, adesinas para que se possa confirmar a possibilidade de que as condições sob as quais os testes foram realizados possam ter influenciado na produção dessas estruturas.

Por fim, o presente trabalho destaca a importância da realização de procedimentos de limpeza visando a diminuição da contaminação por essas bactérias, visto que as bactérias aqui estudadas têm potencial para formação de biofilmes, principalmente em temperatura de refrigeração.

8. REFERÊNCIAS

- Abdullahi UF, Igwenagu E, Mu'azu A, Aliyu S, Umar MI. 2016. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Veterinary World*. 9(1): 12-18.
- Alavi HED, Hansen LT. 2013. Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 29(10): 1253-1268.
- Ali NM, Sarwar K, Mazhar SA, Liaqat I, Andleeb S, Mazhar B, Kalim B. 2017. Effect of medicinal plants, Heavy metals and antibiotics against pathogenic bacteria isolated from raw, Boiled and pasteurized milk. *Pak J Pharm Sci*. 30(6): 2173-2182.
- Arana I, Muela A, Orruno M, Seco C, Garaizabal I, Barcina I. 2010. Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Ecol*. 74(3): 500-509.
- Arslan S, A. Eyi A, Özdemir F. 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science*. 94: 5851-5856.
- Bailone RL, Borra RC, Roça RO, Aguiar L, Harris M. 2017. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (*Bubalus bubalis bubalis*) in different farms and seasons in Brazil. *Cienc. anim. bras. Goiania*. 18: 1-12.
- Baldani JL, Por B, Kirchhof G, Falsen E, Baldani VLD, Olivares FL, Hoste B, Kersters K, Hartmann A, Gillis M, Dobereiner J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 46: 802–810.
- Baum MM, Kainović A, O'Keeffe T, Pandita R, McDonald K, Wu s, Webster P. 2009. Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*. 9(103): 1-13.
- Bayoumi MA, Kamal RM, Abd El Aal SF, Awad EI. 2012. Assessment of a regulatory sanitization process in egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *Int J Food Microbiol*. 158 (3) 225-231.
- Bernades O. 2014. Desafios na produção de leite de búfalas. *Anais I Simpósio Brasileiro de Ruminantes Leiteiros (UDILEITE) – Univ. Federal de Uberlândia/FAMEV*. 33-72.
- Boari CA, Alves MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli RH. 2009. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different condition of cultivation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29(4): 886-895.
- Bogo M, Cruz KL, Revello AG, Corrêa APF, Brandelli A, Frazzon APG, Motta AS. 2017. Thermal Resistance of Proteolytic Enzymes Produced by Psychrotrophic Bacteria Isolated from Buffalo Milk. *International Journal of Dairy Science*. 12 (5): 339-347.

- Bogo M, Cruz KL, Revello AG, Frazzon APG, Motta AS. 2017. An Investigation of Proteolytic, Lipolytic Activity and Biofilm Formation by Psychrotrophic Bacteria Isolated from Buffalo Milk. *Journal of Buffalo Science*. 6, 54-60.
- BRASIL. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, 30 dez. 2011.
- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST. 2017. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Acesso em: 01/01/2018. Disponível em: <<http://brcast.org.br/tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-2017-final.pdf>>
- Castro MR, Fernandes MS, Kakubi DY, Kuaye AY (2017) Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers. *International Dairy Journal*. 68: 9-16.
- Cleto S, Matos S, Kluskens L, Vieira MJ. 2012. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE*. 7: 1–8.
- De Jonghe V, Coorevits A, Van Hoorde K, Messens W, Van Landschoot A, De Vos P, Heyndrickx M. 2011. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl Environ Microbiol*. 77 (2): 460-70.
- Decimo M, Silveti T, Brasca M. 2016. Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria from Bulk Tank Milk. *Journal of Food Sciencer*. 81(4): 944-51.
- Donato ST. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à Biologia Molecular em identificações discrepantes.** Tese (Mestrado, Faculdade de Medicina) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Fazli M, Almlad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T. 2014. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environmental Microbiology*. 16(7): 1961-1981.
- Freitas VR, Sand ST, Simonetti AB. 2010. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. *Rev. Odontol UNESP, Araraquara*, 39(4): 193-200.
- Gallique M, Decoin V, Barbey C, Rosay T, Feuilloley MGJ, Orange N, Merieau A. 2017. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI system to biofilm formation. *PLoS ONE*. 12(1):e0170770.
- Garrido-Sanz D, Meier-Kolthoff JP, Göker M, Martín M, Rivilla R, Redondo-Nieto M. 2016. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLOS ONE*. 11(2): 1-30.
- Garrido-Sanz D, Arrebola E, Granero FM, Garcia-Méndez S, Muriel C, Blanco-Romero E, Martín M, Rivilla R, Redondo-Nieto M. 2017. Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers. *Frontiers in Microbiology*. 8(413): 1-10.
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid, Iqbal M. 2011. Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing Gram positive and Gram negative bacteria isolated from tertiary care hospital of Pakistan. *Malasian Journal of Microbiology*. 7(1): 57-60.

- Hernández-Salmerón JE, Moreno-Hagelsieb G, Santoyo G. 2017. Genome Comparison of *Pseudomonas fluorescens* UM270 with Related Fluorescent Strains Unveils Genes Involved in Rhizosphere Competence and Colonization. *Journal of Genomics*. 5: 91-8.
- Jun, SR, Wassenaar TM, Nookaew I, Hauser L, Wanchai V, Land M, Timm CM, Lu TYS, Schadt CW, Doktycz MJ, Pelletier DA, Ussery DW. 2016. Diversity of *Pseudomonas* genomes, including populus-associated isolates, as revealed by comparative genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 375–83.
- Kasnowski MC, Mantilla SPS, Oliveira LAT, Franco RM. 2010. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 15: 1-19.
- Kazmierczak BI, Schniederberend M, Jain R. 2015. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. *Curr Opin Microbiol.* 28: 78–82.
- Kives J, Orgaz GB, Rivera-Sen A, Varquez J, SanJose. 2005. Interactions in biofilms of *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* cultured in cold UHT milk. *Journal Dairy Science* 88: 4165-4171.
- Koo H, Falsetta ML, Klein MI (2013) The Exopolysaccharide Matrix. *J Dent Res*. 92(12): 1065–1073.
- Lakshmanan D, Nanda J, Jeevaratnam K. 2017. Inhibition of Swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by Methanol extracts of *Alpinia officinarum* Hance. and *Cinnamomum tamala* T. Nees and Eberm. *Natural Product Research*. 1-6.
- Lin H, Shavezipur M, Yousef A, Maleky F (2016) Prediction of growth of *Pseudomonas fluorescens* in milk during storage under fluctuating temperature. *Journal of Dairy Science*. 99(3): 1-9.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Lei L, Yang Y, Mao M, Li H, Li M, Yang Y, Yin J, Hu T. 2015. Modulation of Biofilm Exopolysaccharides by the *Streptococcus mutans* vicX Gene. *Front. Microbiol.* 6:1432.
- Lo CI, Fall B, Sambe-Ba B, Flaudrops C, Faye N, Mediannikov O, Sokhna C, Wade B, Raoult D, Fenollar F. 2017. Value of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in clinical microbiology and infectious diseases in Africa and tropical areas. *African Journal of Microbiology Research*. 11(35): 1360-1370.
- Luczkiewicz A, Kotlarska E, Artichowicz W. 2015. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*. 22:19823–19834.
- Magro M, Fasolato L, Bonaiuto E, Andreani NA, Baratella D, Corraducci V, Miotto G, Cardazzo B. 2016. Enlightening mineral iron sensing in *Pseudomonas fluorescens* by surface active maghemite nanoparticles: Involvement of the OprF porin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1860: 2202–2210.
- Maravić A, Skočibusić M, Šamančić I, Puizina J. 2012. Antibiotic susceptibility profiles and first report of TEM extended-spectrum β -

- lactamase in *Pseudomonas fluorescens* from coastal waters of the Kas̃tela Bay, Croatia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 2039–2045.
- Marchand S, De Block J, De Jonghe V, Coorevits, Heyndrickx M, Herman L. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Compr Rev Food Sci F*. 11: 133–147.
- Martins ML, Pinto UM, Riedel K, Vanetti MCD, Mantovani HC, Araújo EF. 2014. Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(3): 1039-1046.
- Martins ML, Pinto UM, Riedel K, Vanetti MCD. 2015. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(1): 207-217.
- Masak J, Cejkova A, Schreiberova O, Rezanka T. 2014. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS Microbiol Ecol*. 89: 1–14.
- McLean RJC, Pierson LS, Fuqua C. 2004. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods*. 58: 351–360.
- Moura TM, Campos FS, Caierão J, Franco AC, Roehe M, d’Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(5): 617-621.
- Murugan K, Selvanayagi K, Al-Sohaibani S. 2016. Urinary catheter indwelling clinical pathogen biofilm formation, exopolysaccharide characterization and their growth influencing parameters. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 150–159.
- Muller T, Behrendt U, Ruppel S, Waydbrink G, Muller MEH. 2016. Fluorescent Pseudomonads in the Phyllosphere of Wheat: Potential Antagonists Against Fungal Phytopathogens. *Curr Microbiol*. 72: 383–389.
- Nishimura T, Hattori K, Inoue A, Ishii T, Yumoto T, Tsukahara K, Nakao A, Ishihara S, Nakayama S. 2017. Bacteremia or pseudobacteremia? Review of *pseudomonas fluorescens* infections. *World J Emerg Med* 8(2): 151–154.
- Nörnberg MBL, Mentges ML, Silveira ST, Tondo EC, Brandelli A. 2011. A psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity and adhesion to stainless steel. *Journal of Dairy Research*. 78: 257-262.
- Nucera DM, Lomonaco S, Morra P, Ortoffi MF, Giaccone D, Grassi MA. 2016. Dissemination and persistence of *Pseudomonas* spp. In small-scale dairy farms. *Italian J of Food Safety*. 5652(5): 91-94.
- Oliveira GB, Favarin L, Luchese RH, McIntosh D. 2015. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Braz J Microbiol*. 46(2): 313-321.
- Oliveira NM, Foster KR, Durhama WM. 2016. Single-cell twitching chemotaxis in developing biofilms. *PNAS*. 113(23): 6532-37.
- Otton LM, Campos MS, Meneghetti KL, Corção G. 2017. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. *Springer Nature*. 1:1-6.
- Picoli T, Mendes Peter CM, Zani JL, Waller SB, Lopes MG, Boesche KN, Vargas GDA, Hübner SO, Fischer G. 2017. Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus*

- aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. *Microbial Pathogenesis*. 112: 57-62.
- Piercey MJ, Hingston PA, Hansen LT. 2016. Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology*. 223: 63-74.
- Pinto UM, Costa ED, Mantovani HC, Vanetti MDC. 2010. The proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* 07A isolated from milk is not regulated by quorum sensing signals. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 91-96.
- Pinto CLO, Souza LV, Meloni VAS, Bastista CS, Silva R, Martins EMF, Cruz AG, Martins ML. 2017. Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology*. 70:1-7.
- Pisano MB, Scano P, Murgia A, Cosentino S, Caboni P. 2016. Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *Food Chemistry*. 192: 618–24.
- Ponce AR, Martins ML, Araujo EFA, Mantovani HC, Vanetti MCD, 2012. AiiA Quorum-Sensing Quenching Controls Proteolytic Activity and Biofilme Formation by *Enterobacter cloacae*. *Curr Microbiol*. 65: 758-63.
- Puga CH, Orgaz B, SanJose C. 2016. *Listeria monocytogenes* impact on mature or old *Pseudomonas fluorescens* biofilms during growth at 4 and 20 °C. *Frontiers in Microbiology*. 134(7): 1-8.
- Quilès F, Saadi S, Francius G, Bacharouche J, Humber F. 2016. In situ and real-time investigation of the evolution of a *Pseudomonas fluorescens* nascent biofilm in the presence of an antimicrobial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1858: 75–84.
- Ribbe J, Baker AE, Euler S, O'Toole GA, Maier. 2017. Role of Cyclic Di-GMP and Exopolysaccharide in Type IV Pilus Dynamics. *Journal of Bacteriology*. 199(8): 859-16.
- Ricci GD, Domingues PF. 2012. O leite de búfala. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. *Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP* 10(1): 14–19.
- Roder HL, Sorensen SJ, Burmolle M. Studying. 2016. Studying Bacterial multispecies biofilmes: where to start? *Trends Microbiol*. 24(6): 503-13.
- Rossi C, Chaves-López C, Serio A, Goffredo E, Goga BTC, Paparella A. 2016. Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. *Italian J of Food Safety*. 5793(5): 154-157.
- Ruaro A, Andrighetto C, Torriani S, Lombardi A. 2013. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microb*. 34(1): 106–111.
- Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB. 2014. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clin Microb Reviews*. 7: 927–948.
- Scatamburlo TM, Yamazi AK, Cavicchioli VQ, Pieri FA, Nero LA. 2015. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *Journal of Dairy Science* 98(2): 759-764.

- Seca CAT. 2015. **Capacidade de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável de cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado Utilizados na culinária japonesa.** Tese (Graduação em Nutrição) Universidade Federal Fluminense.
- Serrato RV, Sasaki GL, Cruz L, Pedrosa FO, Gorin PAJ, Iacomini M. 2006. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 489–493.
- Simões M, Pereira MO, Sillankorva S, Azeredo J, Vieira MJ. 2013. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 23:4 249-258.
- Souza EL, Meira QGS, Barbosa IM, Athayde AJAA, Conceição ML, Junior JPS. 2014. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(1): 67–75.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Savić-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40(2): 175-9.
- Sun Y, Sun F, Feng W, Qiu X, Liu Y, Yang B, Chen Y, Xia P. 2017. Hyperoside inhibits biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 14(2): 1647-1652.
- Teixeira LV, Bastianetto E, Oliveira DAA. 2005. The water buffalo milk in milky industry. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 29(2): 96-100
- Tempé J, Petit A, Holsters M, Van Montagu M, Schell J. 1977. Thermosensitive step associated with transfer of Ti plasmid during conjugation: possible relation to transformation in crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 2848-2849.
- Tran PN, Savka MA, Gan HM. 2017. In-silico Taxonomic Classification of 373 Genomes Reveals Species Misidentification and New Genospecies within the Genus *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. 8(1296): 1-7.
- Tremblay J, Déziel E. 2008. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol*. 48: 509-515.
- Weiler C, Iflanda A, Naumann A, Kleta S, Noll M. 2013. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *International Journal of Food Microbiology*. 161(2): 61-8.
- Welch K, Cai Y, Strømme M. 2012. A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. *J. Funct. Biomater*. 3: 418-43.
- Xu Y, Chen W, You C, Liu Z. 2017. Development of a Multiplex PCR Assay for Detection of *Pseudomonas fluorescens* with Biofilm Formation Ability. *Journal of Food Science*. 82(10):2337-42.
- Yang A, Tang WS, Si T, Tang JX. 2017. Influence of Physical Effects on the Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal*. 112: 1462–71.
- Yoshioka S, Newell PD. 2016. Disruption of de novo purine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 leads to reduced biofilm formation and a reduction in cell size of surface-attached but not planktonic cells. *PeerJ*. 4: 1543-67.