

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

**AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS ENVOLVIDAS NA ADESÃO
DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM SUPERFÍCIES METÁLICAS DE
EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS**

LETÍCIA SOPEÑA CASARIN

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2014

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

**AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS ENVOLVIDAS NA ADESÃO
DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM SUPERFÍCIES METÁLICAS DE
EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS**

LETÍCIA SOPEÑA CASARIN

Química de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS

Orientador: Eduardo César Tondo

Co-orientador: Adriano Brandelli

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Área de concentração: Microbiologia de Alimentos) como requisito para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2014

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao meu orientador, Eduardo Tondo, pela confiança, amizade e, principalmente pelo incentivo e exemplo de dedicação e determinação.
- ✓ Ao meu co-orientador professor Adriano Brandelli, pela paciência, orientação, ensinamentos e, principalmente pelo exemplo de profissionalismo.
- ✓ Aos professores César Aguzolli e Gabrile Soares pela parceria na realização dos tratamentos de nitretação a plasma.
- ✓ Ao Paulo Soave e ao César Wanke por todo o auxílio da realização dos experimentos do ângulo de contato.
- ✓ Ao prof. Sukarno Olavo Ferreira pela dedicação na realização das análises de microscopia de força atômica.
- ✓ Às bolsistas Aline Oliveira e Silva, Ana Langone, Fabiana Perini e Juliana Engel, que tanto me ajudaram na realização desta pesquisa.
- ✓ Aos colegas de doutorado pela convivência e troca de experiências. Especialmente à Cheila, pela amizade e o companheirismo nas nossas muitas “índias” e à Elindra Rossi pelo carinho e incentivo, mesmo que há alguns quilômetros de distância.
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do Lab. 208 pela convivência e amizade que fizeram com que os dias no lab fossem ainda melhores.
- ✓ À Vera, pela ajuda que não foi nos experimentos, mais foi fundamental e principalmente, pelo carinho, pela amizade e pela convivência que tornou o dia a dia muito mais agradável.
- ✓ A minha nova amiga, colaboradora e “orientadora”, Júnia Novello, pelas trocas de ideias, pela animada convivência, pela amizade, pelo incentivo e por toda a ajuda neste trabalho, sem a qual nada disso seria possível. E também por ter me emprestado um pouco da sua família, que também contribuiu com este trabalho, ao me receber como uma filha em Viçosa.
- ✓ Aos amigos de longe que tanto me incentivaram, por estarem sempre lá, apesar da distância e da minha ausência. E aos amigos de perto que conquistei neste período, pelo carinho e companheirismo que tornaram tudo mais fácil. Especialmente à Michele Hoeltz, que foi a representante de todos, me ouvindo, apoiando e incentivando durante todos esses anos.
- ✓ Às “ex-colegas”, mas sempre amigas Márcia Loiko e Ana Carolina Ritter pela amizade, apoio e incentivo de sempre.
- ✓ Aos meus familiares, por contribuírem, cada um a sua maneira para manter a minha estabilidade emocional. Especialmente a minha vizinha, que mesmo de longe e muitas vezes em silêncio, tanto me incentivou.
- ✓ Aos queridos Bento, Zaida e Giuliana, pelo carinho, amizade, incentivo e por cuidarem de mim como filha e irmã.
- ✓ As minhas irmãs Fabiana e Renata, pela amizade e apoio em todos os momentos. E aos meus sobrinhos Juan e Júlia, que são a minha fonte de energia, por retribuírem a minha ausência tão frequente com tanto carinho. Vocês fazem tudo ter sentido.
- ✓ Aos meus pais, Renato e Marília que foram os meus grandes mestres ao me ensinar os caminhos da persistência, humildade e do estudo, por todo o amor, compreensão, paciência e apoio, mesmo à distância.
- ✓ Ao Fabrício, meu amor, por ser o meu maior incentivador, por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, por estar sempre ao meu lado, até mesmo nas jornadas de trabalho em fins de semana e feriados, por todos os cálculos, pela revisão do trabalho, pelas ideias, sem as quais este trabalho não existiria. Acima de tudo, por cuidar de mim e por estar presente com o seu amor, nos bons e maus momentos.

AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS ENVOLVIDAS NA ADESÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM SUPERFÍCIES METÁLICAS DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS¹

Autor: Letícia Sopeña Casarin

Orientador: Eduardo César Tondo

Co-orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

A qualidade e a segurança dos produtos fabricados pelas indústrias de alimentos ficam comprometidas quando bactérias aderem e se multiplicam nas superfícies dos equipamentos utilizados na produção de alimentos. O aço inoxidável AISI (*American Iron and Steel Institute*) 304 e AISI 316 são os mais utilizados na fabricação de diversos tipos de equipamentos e utensílios para as indústrias de alimentos, sendo que muitos deles contêm soldas entre as junções de suas diferentes partes. Alguns pesquisadores relacionam a presença destas soldas à rugosidade e à dificuldade de higienização e consequente adesão microbiana nestas estruturas. No entanto, atualmente, existem poucos trabalhos que estudam o processo de adesão microbiana em soldas. O presente trabalho teve como objetivo investigar a adesão de um patógeno alimentar Gram-negativo (*Salmonella* Enteritidis) e um Gram-positivo (*Listeria monocytogenes*) em aços inoxidáveis e em soldas MIG (*Metal Inert Gas*) e TIG (*Tungsten Inert Gas*); avaliar a influência da topografia e rugosidade dos materiais e a hidrofobicidade das superfícies e das células no processo de adesão; determinar a energia livre de interação e a energia de adesão entre as células e as superfícies e, por fim; estudar o efeito da modificação da superfície dos aços inoxidáveis através de nitretação a plasma na adesão de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o número de células aderidas às superfícies dos dois tipos de soldas e dos dois aços inoxidáveis para ambas as bactérias e indicaram que não houve correlação entre a adesão e a hidrofobicidade e a rugosidade das superfícies. O tratamento de nitretação a plasma foi capaz de alterar as superfícies dos aços inoxidáveis, reduzir a adesão bacteriana e, portanto, mostra-se como uma promissora tecnologia para prevenção da adesão microbiana.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (116 p.), Março, 2014.

EVALUATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL INTERACTIONS INVOLVED IN THE ADHESION OF FOOD PATHOGENS IN METAL SURFACES OF EQUIPMENT USED IN FOOD PRODUCTION¹

Author: Leticia Sopeña Casarin

Advisor: Eduardo César Tondo

Co-advisor: Adriano Brandelli

ABSTRACT

The quality and safety of products manufactured by food industry are threatened when bacteria attach to and grow on surfaces of equipment used in food production. The stainless steel AISI (American Iron and Steel Institute) 304 and AISI 316 are the most various types used in the manufacture of equipment and utensils for the food industries. Many of these equipments contain welds between its different parts. Some researchers related the presence of these welds to increase the roughness and the difficulty of cleaning, and consequently microbial adhesion occurs in these structures. However, currently, there are few researchers that study the process of microbial adhesion in welds. The present study aimed to investigate the adhesion of a Gram-negative (*Salmonella* Enteritidis) and Gram-positive (*Listeria monocytogenes*) food pathogens in stainless steels and MIG (*Metal Inert Gas*) and TIG (*Tungsten Inert Gas*) welds; evaluate the influence of topography and roughness of the materials and the hydrophobicity of the material surfaces and cells in the attachment process and determine the free energy of interaction and adhesion energy between cells and surfaces; and finally, also to evaluate the effect of plasma nitriding surface modification of stainless steels on the adhesion of *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes*. The results showed that there is no significant difference ($p > 0.05$) between the numbers of cells attached to the surfaces of welds and stainless steel for both bacteria and indicated that there was no correlation between adhesion and hydrophobicity and roughness of surfaces. The plasma nitriding treatment was able to modify the surfaces of the stainless steel reducing bacterial adhesion and therefore there is demonstrated a promising technology for preventing microbial adhesion.

¹Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Food Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (116 p.), March, 2014.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Patógenos alimentares	4
2.2. Adesão microbiana e formação de biofilme	5
2.2.1. Fases da adesão bacteriana	7
2.2.2. Aspectos físico-químicos na adesão microbiana	11
2.3. Adesão de microrganismos às superfícies de materiais	17
2.4. Controle da adesão e formação de biofilmes.....	20
2.4.1. Alteração de Superfícies Utilizando Nitretação a Plasma	21
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO GERAL	84
5. CONCLUSÕES	99
6. PERSPECTIVAS.....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE TABELAS

2. Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Componente da tensão superficial de líquidos em temperatura ambiente (25°C).....	12
--	----

3.1 Artigo 1

Tabela 1: Materials used in the assays and their characteristics.	41
Table 2: Surface tension parameters for polar and apolar liquids used to calculate the physiochemical parameters (in mJm^{-2}).	41
Table 3: Water contact angle (in degrees) of the cells and surfaces with their respective hydrophobicity parameters (ΔG_{wi}).	42

3.2 Artigo 2

Table 1: Water contact angle (in degrees) of the cells and surfaces with their respective hydrophobicity parameters (ΔG_{wi}).	67
Table 2: Free energy of adhesion ($\Delta G_{1w2}^{\text{TOT}}$) between the bacteria and stainless steels (AISI 304 and AISI 316) surfaces.	67

3.3 Artigo 3

Table 1: Water contact angle (in degrees) of the stainless steels surfaces (plasma treated and untreated) and bacteria surfaces and, also their respective hydrophobicity parameters.	83
Table 2: Free energy of adhesion ($\Delta G_{1w2}^{\text{TOT}}$) between the bacteria and stainless steels (AISI 304 and AISI 316) plasma treated and untreated.	83

LISTA DE FIGURAS

2. Revisão Bibliográfica

Figura 1: Principais etapas envolvidas na adesão e colonização microbiana em superfícies..... 8

Figura 2: Ângulo de contato (Θ) entre uma gota e uma superfície.....15

3.1 Artigo 1

Figure 1: Schematic drawing of weld coupon.42

Figure 2: Representative scanning electron micrographs, showing the adherence of *S. Enteritidis* (SE 86) on MIG polish welds (A, B and C) and on TIG unpolished welds (D, E and F), after 1 h of contact.43

Figure 3: *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* adhesion to stainless steel without welding (■) and welds: unpolished MIG welds (▲), polished MIG welds (Δ) unpolished TIG welds (●) and polished TIG welds (○) after 0, 1 and 4 h of contact.44

3.2 Artigo 2

Figure 1: Representative scanning electron micrographs, showing the adherence of *L. monocytogenes*: on AISI 304 after 8 h of contact (A), on AISI 304 after 1 h (B) and *S. Enteritidis* (SE 86): on AISI 304 after 1 h (C), on AISI 316 after 8h (D, E) and on AISI 316 after 1h (F).64

Figure 2: *Salmonella* Enteritidis (SE86) and *Listeria monocytogenes* (J11) adhesion to stainless steel AISI 304 (■) and AISI 316 (Δ) after 0, 1, 2, 4, 6 and 8 h of contact.65

Figure 3: AFM images of *L. monocytogenes* (J11) adhered on stainless steels AISI 304 (A,B) and 316 (C,D), and *S. Enteritidis* (SE 86) adhered on stainless steels AISI 304 (E,F) and AISI 316 (G,H).66

Figure 4: AFM images (2D and 3D) of stainless steels AISI 304 (A, B) and AISI 316 (C, D) and their respective roughness (Ra).66

3.3 Artigo 3

Figure 1: Antibacterial Rate (AR) of Stainless steels AISI 304 and AISI 316 plasma nitriding treated.....82

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) continua sendo um problema em todo mundo. Evitar a ocorrência desses surtos é um dos principais objetivos dos órgãos reguladores, empresas de alimentos e também de centros de pesquisa da área. Apesar de existirem diversas legislações que objetivam a redução das DTA, as medidas de controle devem passar pela ação das indústrias de alimentos e serviços de alimentação. Nesses estabelecimentos devem ser mantidas práticas de trabalho higiênico-sanitárias de maneira a minimizar os riscos de contaminação durante o processo produtivo.

A adesão bacteriana às superfícies que entram em contato com os alimentos é uma das principais fontes de contaminação, uma vez que os microrganismos aderidos podem dificultar a higienização das superfícies, propiciando a contaminação cruzada e, conseqüentemente, a ocorrência de surtos. Sabe-se que, em determinadas condições, os microrganismos aderem e interagem com as superfícies de equipamentos e utensílios, podendo formar estruturas conhecidas como biofilmes.

Muitas bactérias patogênicas já foram isoladas da superfície de

equipamentos e utensílios utilizados em empresas de alimentos, como por exemplo, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Existe uma variedade de materiais que são utilizados em indústrias de alimentos e serviços de alimentação, dentre eles, o aço inoxidável é o mais empregado para confecção de equipamentos. Contudo, em muitos destes há a presença de soldas, estruturas utilizadas para junção de metais, como *Metal Inert Gas* (MIG) e *Tungsten Inert Gas* (TIG), que dificultam a realização dos processos de higienização, propiciam maior retenção de resíduos e, conseqüentemente podem facilitar os processos de adesão e formação de biofilme microbiano.

Além das propriedades inerentes aos equipamentos, como rugosidade e hidrofobicidade, os fatores microbianos (hidrofobicidade, carga elétrica e síntese de substâncias extracelulares) e os fatores ambientais (pH, temperatura e nutrientes) também auxiliam na compreensão e estudo da adesão microbiana. Assim, conhecer, compreender e estudar tais fatores contribui para o estabelecimento de estratégias eficazes de controle e prevenção de microrganismos patogênicos na cadeia de produção de alimentos.

No sentido de prevenção da adesão e conseqüente formação de biofilme microbiano, algumas alternativas tecnológicas vêm sendo desenvolvidas e testadas. Dentre elas, a modificação de superfícies de aço

inoxidável por meio da técnica de implantação iônica ou nitretação a plasma tem sido abordada como uma promissora tecnologia.

Considerando as dúvidas ainda existentes com relação aos mecanismos envolvidos na adesão microbiana, o conhecimento das interações físico-químicas envolvidas na adesão de patógenos alimentares aos principais materiais utilizados em equipamentos de indústrias de alimentos, adquire grande relevância. Além disso, há poucas e recentes pesquisas sobre a alteração de superfícies que entram em contato com alimentos. Com base nesses fatos, o objetivo geral deste trabalho foi investigar as interações físico-químicas envolvidas na adesão de *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes* às superfícies dos aços inoxidáveis (AISI 304 e AISI 316) e soldas MIG e TIG utilizados em equipamentos de processamento de alimentos. Os objetivos específicos foram: avaliar a influência da rugosidade das superfícies e da hidrofobicidade das superfícies e das células bacterianas na adesão destes microrganismos aos aços e às soldas e avaliar o efeito do tratamento de nitretação a plasma dos aços inoxidáveis (AISI 304 e AISI 316) na adesão bacteriana, com o intuito de apresentar uma alternativa para controle da adesão e conseqüente formação de biofilme.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Patógenos alimentares*

A formação de biofilmes após a adesão de patógenos como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em superfícies que entram em contato com os alimentos tem sido reconhecida como um fator que pode contribuir com os surtos de infecções alimentares (BONSAGLIA *et al*, 2014; SHI & ZHU, 2009; FRANK & CHMIELEWSKI, 2003).

Salmonella é um patógeno alimentar Gram-negativo e mesófilo que tem sido identificado como o principal causador de DTA em vários países (FORSYTHE, 2010; European Food Safety Authority (EFSA), 2010; CHIA *et al*, 2009). Durante a última década a salmonelose tem sido relatada como a doença de origem alimentar mais frequente no Brasil e é o principal agente causador de DTA no RS, desde 1997 (BRASIL, 2013; TONDO & RITTER, 2012; MÜRMAN *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2007; RS/DVS, 2006). Mais de 90% das cepas que causaram salmoneloses alimentares no RS, de 1999 a 2008, foram sorotipificadas como *Salmonella* (S.) Enteritidis com o mesmo perfil genotípico (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Segundo Tondo *et al* (2010) a *S. Enteritidis* que causa surtos no Estado do RS adere ao polietileno e ao aço inoxidável de forma semelhante a *S. Bredney* e

a *S. Typhimurium*, porém a *S. Enteritidis* forma grumos o que não ocorre com as demais, indicando a necessidade de investigar as interações que ocorrem entre esta bactéria e as superfícies.

L. monocytogenes é um microrganismo Gram-positivo, mesófilo com características psicrotróficas (GANDHI & CHIKINDAS, 2007; WILKS, MICHELS & KEEVIL, 2006) que apresenta importância mundial como patógeno de alimentos, uma vez que tem provocado vários surtos com graves consequências (CARPENTIER & CERF, 2011; TAKAHASHI, et al, 2009). Este patógeno possui dose infectante baixa e pode causar altas taxas de mortalidade, variando de 20 a 30% (SZLAVIK et al, 2012; BUCHANAN et al, 2004). Este microrganismo tem ganhado importância na última década devido à ocorrência de inúmeros surtos em todo mundo (JENSEN et al, 2010; GOULET et al, 2008) e tem sido isolado em muitos locais dentro de plantas de produção de alimentos (CARPENTIER & CERF, 2011; ORTIZ et al, 2010; BONG JAE, TRAVIS & NEHAL, 2009; SHARMA & ANAND, 2002). Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade desta bactéria em aderir e formar biofilme em aço inoxidável, vidro e borracha (BONSAGLIA, et al, 2014; CHAVANT et al., 2002; LUNDE´N, et al, 2002; CHAE & SCHRAFT, 2000; LERICHE & CARPENTIER, 2000).

2.2. Adesão microbiana e formação de biofilme

Biofilmes são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multi-espécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos - EPS), em cuja formação os microrganismos

exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Os biofilmes que ocorrem na natureza consistem em uma dispersão de partículas coloidais (células microbianas, minerais precipitados, detritos biológicos) em um hidro gel [substâncias microbianas poliméricas extracelulares (EPS) e polímeros extracelulares, tais como muco, colágeno, ou DNA] (STEWART, 2014). Esses EPS podem conter polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácidos nucleicos e teicóicos, DNA extracelular e outras substâncias, contendo de 85 a 95% de água (FLEMMING & WINGENDER, 2010; SHI & ZHU, 2009).

Os EPS promovem proteção ao biofilme, dificultando o acesso de agentes biocidas, concentrando nutrientes, sequestrando metais e toxinas e prevenindo a desidratação (CARPENTIER, 1993).

A maioria dos microrganismos em seus *habitats* naturais está aderida a superfícies (DAVEY & O'TOOLE, 2000), indicando a grande vantagem seletiva dos microrganismos organizarem-se em biofilmes (CARPENTIER, 1993).

Os biofilmes têm importância em várias atividades humanas, por exemplo, em estações de tratamento de águas ou de efluentes, eles removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica. Numerosos bio-processos também utilizam biofilmes (XAVIER et al, 2005). Nas indústrias de alimentos, a formação de biofilmes tem grande importância, uma vez que pode dificultar a higienização das superfícies que entram em contato com o alimento, possibilitando a ocorrência de surtos. Isto ocorre, pois os microrganismos na forma de vida sésil resistem significativamente mais aos sanificantes utilizados nos procedimentos de higienização (BOARI et al, 2009) Alguns pesquisadores sugerem que estes

microrganismos sejam 500 (COSTERTON et al, 1995) ou até 1000 vezes (DRENKARD, 2003) mais resistentes que as células planctônicas.

Atualmente não existe um consenso em relação ao conceito diferencial entre biofilme e adesão microbiana. Alguns autores consideram como biofilme os agrupamentos celulares com mais de 10^7 UFC/cm² (ANDRADE, BRIDGEMAN & ZOTTOLA, 1998), no entanto outros aceitam como biofilme um número de células aderidas entre 10^3 e 10^5 células/cm² (WIRTANEN, HUSMARK & MATILLA-SANDHOLM, 1996; RONNER & WONG, 1993).

A colonização microbiana e consequente formação de biofilmes são controladas por processos químicos, físicos e microbiológicos (GARRETT et al, 2008). A adesão do microrganismo é a etapa inicial deste processo, que resulta no acúmulo de biomassa e materiais extracelulares na superfície de um substrato (HORI & MATSUMOTO, 2010; VALCARCE, BUSALMEN & SÁNCHEZ 2002).

A adesão microbiana em superfícies pode ser definida como a energia necessária para que ocorra a união entre o suporte e a célula, ou seja, o trabalho necessário para removê-la e retorná-la ao seu estado original (AZEREDO, HENRIQUES & LIMA, 2012).

2.2.1. Fases da adesão bacteriana

A adesão de microrganismos às superfícies pode ocorrer diretamente pelo contato com alimentos contaminados ou indiretamente por partículas bacterianas do ar, iniciando-se o processo de adesão da bactéria ao substrato (KUSUMANINGRUM et al, 2003).

A adesão bacteriana consiste em uma atração da célula pela superfície, seguida da adsorção e posteriormente aderência da célula bacteriana (KATSIKOIANNI & MISSIRLIS, 2004). Muitos mecanismos para adesão microbiana em várias superfícies têm sido propostos, sendo que a teoria proposta por Characklis e Marshall (1990) tem sido a mais aceita. Esta teoria propõe que o mecanismo de adesão e colonização da superfície é um processo de oito etapas que incluem principalmente a formação inicial de um filme condicionante, a adesão reversível e irreversível e o desprendimento de células do biofilme maduro para subsequente recolonização. Na Figura 1 são apresentadas algumas das etapas envolvidas na colonização microbiana de superfícies.

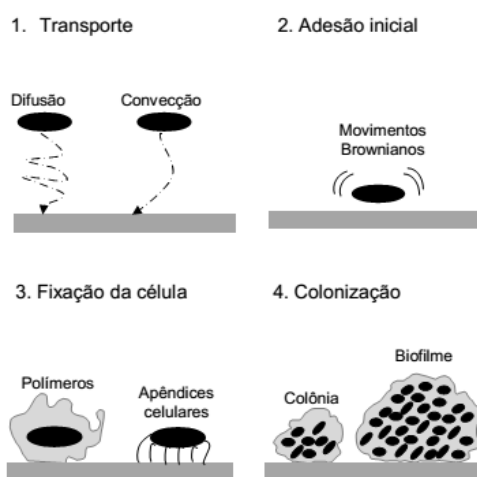


Figura 1: Principais etapas envolvidas na adesão e colonização microbiana em superfícies. (Fonte: OLIVEIRA, 2001, apud NOVELLO, 2012).

O filme condicionante é estabelecido nos primeiros 5 a 10 segundos (MITTELMAN, 1998) pela ação da força gravitacional ou pelo movimento do fluido que conduzirá partículas orgânicas e inorgânicas, como lipídeos, sais minerais e proteínas, à superfície do substrato em meio aquoso (GARRETT et al, 2008; DUNNE et al, 2002).

Outra fase importante para a fixação microbiana é o seu transporte à superfície. Em fluidos em repouso, o microrganismo se desloca por difusão devido aos movimentos Brownianos ou ainda por causa da mobilidade resultante dos apêndices celulares. Porém, em fluidos em movimento, a aproximação das células à superfície é resultante da convecção e a velocidade do transporte convectivo é superior ao por difusão (HORI & MATSUMOTO, 2010; CHARACKLIS, 1981).

Uma vez que a célula esteja próxima de uma superfície (50 nm), a adesão inicial entre célula e superfície, ocorre em consequência de forças de curto e longo alcance e um processo reversível ou irreversível se inicia. No processo reversível, o microrganismo após se fixar à superfície, continua a apresentar movimentos Brownianos, sendo removido graças à ação de forças de tensão de corte, ou então, pelo próprio movimento celular. Neste momento, há também a ação de forças de longo alcance, van der Waals e eletrostáticas, que fixam a célula à superfície. Contudo, quando o microrganismo deixa de exibir movimentos Brownianos, a adesão torna-se irreversível, e desta forma este dificilmente é removido da superfície (HORI & MATSUMOTO, 2010; CHARACKLIS, 1981).

Desta forma, a carga superficial do microrganismo, adquirida quando o mesmo está imerso em soluções aquosas, também é outro fator determinante durante a etapa de adesão. Esta carga pode ser resultante da adsorção de íons ou ionização de grupos químicos, uma vez que na superfície celular existem compostos ácidos (carboxílicos e fosfato) e básicos (grupos amina) que reagem com os íons OH^- e H_3O^+ presentes na solução. Além disso, este fenômeno é dependente do

pH do meio, sendo que em soluções próximas da neutralidade, as bactérias possuem uma carga global negativa devido ao fato de haver um maior número de grupos fosfato e carboxílicos, porém, quando o pH é muito baixo, as bactérias podem apresentar uma carga global positiva, devido à predominância de grupos amina (OLIVEIRA, 2001, *apud* NOVELLO, 2012).

Alguns microrganismos são capazes de aderir firmemente a superfícies em ambientes de baixa força iônica, nestas situações a adesão pode ser explicada pelo fato de que as células apresentam estruturas extracelulares, como fímbrias e pilis, ou produzem exopolissacarídeos, capazes de ultrapassar a barreira de energia imposta pelas forças eletrostáticas repulsivas e reduzir a distância entre célula e superfície (AZEREDO, HENRIQUES & LIMA, 2012; HORI & MATSUMOTO, 2010).

Finalmente, após o estabelecimento de uma interação firme entre a célula e a superfície, por meio de ligações físico-químicas específicas, como ligações covalentes, iônicas e de hidrogênio, ou ainda por meio de ligações estabelecidas por estruturas extracelulares específicas produzidas pelos microrganismos (apêndices celulares filamentosos ou polímeros extracelulares), um processo de múltiplas etapas é iniciado e leva à formação de uma complexa comunidade microbiana (BOS, VAN DER MEI & BUSSCHER, 1999). Nesta comunidade as células se multiplicam e originam novas camadas de células, formando micro colônias que se desenvolvem dando origem a um filme biológico. Este filme fica embebido em uma matriz composta por macromoléculas (polissacarídeos e proteínas) excretadas pelos microrganismos, formando uma estrutura, conhecida como biofilme (HORI & MATSUMOTO, 2010).

2.2.2. Aspectos físico-químicos da adesão microbiana

Várias abordagens distintas têm sido utilizadas para descrever e prever a adesão bacteriana em superfícies. Em geral, a adesão pode ser descrita pela Teoria Termodinâmica, a qual utiliza a equação modificada de Dupré (Equação 1), a Teoria DLVO - Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (VERWEY & OVERBEEK, 1948; DERJAGUIN & LANDAU, 1941) e a DLVO Estendida, teoria que complementa a anterior (SHARMA & HANUMANTHA RAO, 2003).

Segundo a Teoria Termodinâmica, a adesão ocorrerá se durante o processo houver redução da variação da energia livre de Gibbs total (ΔG^{TOT}). Neste modelo (Equação 1), não são consideradas as interações eletrostáticas e as interações específicas mediadas por exopolímeros ou apêndices extracelulares (AZEREDO et al, 2012; VAN OSS, 1991).

$$\Delta G^{TOT} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad (1)$$

Onde, γ_{sb} é a tensão superficial entre a superfície e a bactéria, γ_{sl} a tensão superficial entre a superfície e o líquido e γ_{bl} a tensão superficial entre a bactéria e o líquido, sendo as unidades expressas em mJ.m^{-2} (VAN OSS, 1991).

A adesão de um microrganismo a uma superfície sólida em solução aquosa ocorre somente se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, a interface bactéria/líquido e a interface superfície de adesão/líquido terão que ser substituídas pela interface bactéria/superfície de adesão (CHAVES, 2004). Como todo sistema na natureza, a interação entre o microrganismo e a superfície também ocorrerá em direção à diminuição de energia livre. Isso significa que a adesão do microrganismo acontecerá se ΔG^{TOT} for

negativa e será termodinamicamente desfavorável, se for positiva. O cálculo das tensões superficiais γ_{sl} e γ_{bl} é possível pela obtenção da medida do ângulo de contato (θ) entre a superfície, ou bactéria, com líquidos padrões, cuja componente da tensão interfacial é conhecida (Tabela 1) (SHARMA & HANUMANTHA RAO, 2003).

Tabela 1: Componente da tensão superficial de líquidos em temperatura ambiente (25°C).

Líquido	γ_l^{TOT} (mJ.m ⁻²)			
	γ_l^{TOT}	γ_l^{LW}	γ_l^+	γ_l^-
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58	39	2,28	39,6
α -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0	0

γ_l^{TOT} : Tensão superficial total ; γ_l^{LW} : Tensão superficial relativa a componente de Lifshitz – van der Waals; γ_l^+ : Tensão superficial relativa a componente base de Lewis; γ_l^- : Tensão superficial relativa a componente ácido de Lewis. Fonte: adaptado de van der Mei, Bos & Busscher, 1998.

A Teoria DLVO, considera os microrganismos partículas quimicamente inertes, ou seja, são como coloides liofóbicos. Isso, porque a maioria das bactérias não excede 2,0 μm de comprimento e a sua densidade é superior a da água, podendo, portanto ser consideradas, como partículas coloidais vivas (MARSHALL, 1976). No entanto, esta Teoria não considera os aspectos microbiológicos da adesão. A Teoria DLVO prevê que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Lifshitz - van der Waals e as forças de dupla camada elétrica (Equação 2), que geralmente são repulsivas.

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{EL} + \Delta G^{LW} \quad (2)$$

Onde, ΔG^{EL} é a energia livre das forças da dupla camada elétrica e ΔG^{LW} a energia livre das forças de Lifshitz - van der Waals (VAN OSS et al, 1990). A intensidade destas forças é diretamente proporcional ao tamanho das partículas que interagem e na razão inversa da distância da superfície. A superfície de um sólido eletricamente carregado em solução aquosa atrai íons de sinal contrário ao do meio e simultaneamente repele os de sinais iguais. Uma vez que a maioria das superfícies adquire carga negativa em solução, as forças da dupla camada elétrica apresentam, geralmente, um caráter repulsivo (OLIVEIRA, 2006). Dessa forma, a adesão somente será irreversível quando a variação de energia livre de Gibbs total for negativa ($\Delta G^{TOT} < 0$), e a distância entre a superfície e o microrganismo for tão mínima tanto quanto possível, entre 2 nm a 5 nm.

Esta teoria considera apenas a atração das forças de longo alcance. No entanto, quando uma partícula ou microrganismo está muito próximo (2 nm - 5 nm) de uma superfície, são as forças de curto alcance que regulam o processo. Estas forças, denominadas não-DLVO, são representadas pelas forças de repulsão de Born, interações hidrofóbicas, forças de hidratação e pontes poliméricas (VAN OSS, 1995). Van Oss e colaboradores, em 1994, integraram os aspectos termodinâmicos da adesão à teoria DLVO. Essa teoria é conhecida como XDLVO ou DLVO Estendida, e consideram as forças de curto alcance, principalmente as interações hidrofóbicas (HARIMAWAN et al, 2013). A variação da energia livre das interações totais numa superfície (ΔG^{TOT}) (Equação 3) é resultante do somatório das energias livres das interações de Lifshitz - van der Waals (ΔG^{LW}), interações ácido-base de

Lewis (ΔG^{AB}), forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (ΔG^{EL}) e interações resultantes dos movimentos Brownianos (ΔG^{BR}) (VAN OSS, 1991):

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{EL} + \Delta G^{BR} \quad (3)$$

O contato direto entre a bactéria e o substrato pode ser estabelecido em nível molecular por meio de substâncias poliméricas extracelulares sintetizadas. Esses compostos não estão sujeitos ao mesmo tipo de repulsão que as bactérias, portanto podem facilitar a adesão entre a bactéria e a superfície por várias combinações de ligações químicas (eletrostáticas, covalentes e de hidrogênio) e interações dipolo (dipolo-dipolo, dipolo-induzido dipolo e íon-dipolo), além de interações hidrofóbicas. Por isso, a bactéria pode ter diferentes tipos de adesividade (MARSHALL, 1992).

Em 1995, Van Oss e Giese desenvolveram uma metodologia de cálculo que permite quantificar a hidrofobicidade da superfície por meio de componentes da tensão superficial. A hidrofobicidade microbiana é definida pela energia de atração entre células apolares ou levemente polares, imersas em fase aquosa (CERCA et al, 2004; VAN OSS & GIESE, 1995).

A hidrofobicidade das células pode ser determinada por diversos métodos, entre eles a adesão microbiana a hidrocarbonetos, coluna de interação hidrofóbica, a adesão a superfícies hidrofóbicas, agregação por adição de sais, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico e a medida do ângulo de contato (CHAVES, 2004; VANDER MEI, BOS & BUSSCHER, 1998). Contudo a técnica que melhor determina a hidrofobicidade é a do ângulo de contato (DOYLE, 2000).

O ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida consiste no ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado (Figura 2). Esse ângulo permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Se o líquido for a água, o ângulo formado será relacionado à hidrofobicidade da superfície. Ângulos inferiores a 50° indicam superfície hidrofílica e ângulos superiores a 50° , superfície hidrofóbica (VAN OSS & GIESE, 1995). No entanto, para Vogler (1998), uma superfície hidrofóbica deve apresentar ângulo de contato com a água superior a 65° .



Figura 2: Ângulo de contato (Θ) entre uma gota e uma superfície.

Através da equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes é possível relacionar o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida com as componentes da tensão superficial do líquido e da superfície (Equação 4). Para a realização das medidas destes ângulos são necessários um líquido apolar e dois polares.

$$(1 + \cos\theta)\gamma_l^{TOT} = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^-\gamma_l^+}) \quad (4)$$

Onde, γ_l^{TOT} é a tensão superficial total do líquido; γ_l^{LW} e γ_s^{LW} são as tensões superficiais das forças de interação de Lifshitz - van der Waals; γ_l^+ e γ_s^+

são as componentesceptoras de elétrons do componente ácido-base de Lewis da tensão superficial; e γ_l^- e γ_s^- são as componentes doadoras de elétrons do componente ácido-base da tensão superficial, considerando-se que são as tensões para os líquidos (l) e para a superfície (s) analisados. Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula, e, portanto, a Equação 4 reduz-se à Equação 5:

$$\gamma_s^{LW} = \frac{\gamma_l^{TOT}}{4} (1 + \cos\theta)^2 \quad (5)$$

As equações permitem determinar as componentes da tensão superficial de líquidos a 25 °C (Tabela 1) (VAN DER MEI, BOS & BUSSCHER, 1998). As componentes da tensão superficial são utilizadas para calcular a variação de energia livre de interação total (ΔG_{SWS}^{TOT}). Segundo esta metodologia, a hidrofobicidade é definida como o grau de interação entre as moléculas de um determinado material imerso em água. Se os valores de ΔG_{SWS}^{TOT} forem inferiores a zero, a variação de energia livre total de interação entre as moléculas de uma superfície imersa em água é atrativa ($\Delta G_{SWS}^{TOT} < 0$), o que indica que as moléculas da superfície apresentam menor afinidade com a água do que entre si mesmas e que, portanto, esta superfície é considerada hidrofóbica. No entanto, se esta variação de energia for positiva, ou seja, uma interação de caráter repulsivo ($\Delta G_{SWS}^{TOT} > 0$), a superfície é considerada hidrofílica. É importante salientar que quanto maior for o valor absoluto de ΔG_{SWS}^{TOT} , mais hidrofóbica (valores negativos) ou mais hidrofílica (valores positivos) é a superfície (VAN OSS & GIESE, 1995).

Todas as teorias apresentadas anteriormente levam em consideração apenas os aspectos físico-químicos e termodinâmicos da adesão, portanto, não levam em consideração o fato de os microrganismos serem células vivas, cujas características microbiológicas são capazes de condicionar a adesão (CHAVES, 2004).

2.3. Adesão de microrganismos às superfícies de materiais

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais, vitaminas e água que formam uma espécie de crosta sobre a superfície. Dessa forma, os microrganismos continuam a se multiplicar, gerando um substrato altamente propício para a aderência de outras bactérias, inclusive as patogênicas (SHI & ZHU, 2009). Isso faz com que as superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na produção de alimentos sejam focos de contaminação microbiana (HOLAH & THORPE, 1990), além disso, no biofilme, os organismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos (KIM, RYU, BEUCHAT 2006, RYU & BEUCHAT, 2005).

Devido a isto, as superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com os alimentos são uma das principais fontes de contaminação microbiológica nos locais de produção de alimentos (WONG, 1998). Entre os materiais mais utilizados em equipamentos empregados no processamento de alimentos, tanto em nível industrial quanto nos serviços de alimentação e residências, o aço inoxidável tem sido o material de escolha devido à sua resistência à corrosão e oxidação, por ter uma maior durabilidade, por ser de fácil fabricação e também por ter uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando

comparado com cobre, alumínio e com a ampla variedade de polímeros (ROSSONI & GAYLARDE, 2000; HOLA & THORPE, 1990). Os aços inoxidáveis com as especificações *American Iron and Steel Institute* (AISI) 304 e AISI 316 são os mais utilizados na fabricação dos mais diversos tipos de equipamentos para a indústria de alimentos (EHEDG, 2007; HOOD & ZOOTOLO, 1997).

A liga de aço inoxidável 304 é de aço austenítico, com um mínimo de 18% de cromo, de 8% de níquel e até 0,08% de carbono. A liga de aço inoxidável 316 é também de aço austenítico, com molibdênio até 3% e teor de níquel mais elevado (10-14%) do que o tipo 304 (MARTINS, MOREIRA & MARTINS, 2014). O que essencialmente distingue o tipo de aço inoxidável 316 do tipo 304 é a adição de molibdênio até cerca de 3%. Este componente aumenta a resistência à corrosão desta liga em vários ambientes (salmouras, branqueamento, fluidos biológicos, etc), e, em particular, reduz ou inibe a corrosão localizada induzida por cloretos (MARTINS, MOREIRA & MARTINS, 2014). Apesar dessa resistência química, o maior custo do tipo 316, faz com este aço seja menos utilizado na fabricação de equipamentos para alimentos, tornando o aço inoxidável tipo 304 o mais utilizado pelos fabricantes de equipamentos para indústria alimentícia (SINDE & CARBALLO, 2000).

Em muitos equipamentos é necessária a junção de peças de aço inoxidável, a qual é realizada através do processo de soldagem. As soldas TIG (*Tungsten Inert Gas*) e MIG (*Metal Inert Gas*) são as mais utilizadas nestes casos (LEWAN, 2014).

A soldagem TIG é um processo no qual a união de peças metálicas é produzida pelo aquecimento e fusão destas através de um arco elétrico estabelecido

entre um eletrodo de tungstênio, não consumível, e as peças a unir (EHEDG, 1993). Este tipo de solda possui um excelente controle do calor cedido à peça, devido ao controle independente da fonte de calor e da adição de metal de enchimento. É um processo bastante adequado à soldagem de peças de pequena espessura com uma eficiente proteção contra contaminação, permitindo a soldagem de materiais de difícil soldabilidade, com ótimos resultados. O eletrodo não é consumível, portanto a soldagem não adiciona metal de enchimento, sendo a melhor opção, se não a única, para junção de peças finas. Além disso, não existem reações metal-gás e metal-escória, propiciando uma ótima visibilidade para o soldador e uma melhor precisão na solda (EHEDG, 1993). O elevado custo do gás inerte torna a soldagem TIG mais cara do que outras soldas, no entanto este processo fornece soldas com alta qualidade e bom acabamento de superfície.

No processo de soldagem MIG o arco elétrico é aberto entre um arame alimentado continuamente e o metal de base. A região fundida é protegida por um ou mais gases (argônio, CO_2 , hélio ou O_2), que podem ser inertes (MIG) ou ativos (MAG) (EHEDG, 1993).

As vantagens desse processo são: a facilidade de operação, a alta produtividade, a possibilidade de automatização, baixo custo, não formação de escória, produção de um cordão de solda relativamente bem acabado e uma facilidade de execução da soldagem. Entretanto, possui diversas limitações como a complexa regulagem do processo, o fato de não poder ser executada em presença de corrente de ar, a limitada posição de soldagem, possibilitando grande porosidade no cordão de solda, frequente produção de respingos e difícil manutenção das soldas (EHEDG, 1993).

Conforme Eastwood (1993), soldas de baixa qualidade contribuem muito com problemas higiênicos, por uma maior retenção de produtos em suas fendas e rugosidades, além de dificultar as etapas de limpeza e desinfecção. Entretanto, soldas com bom acabamento podem evitar a formação e facilitar a remoção de biofilmes nas superfícies (TIDE et al, 1999).

Atualmente, não existem pesquisas avaliando a influência do tipo de solda na adesão de microrganismos patogênicos e, portanto, ainda não se sabe ao certo qual tipo de solda é mais adequada para ser utilizada na junção de metais que entrarão em contato com alimentos.

2.4. Controle da adesão e da formação de biofilmes

A principal forma de controle da adesão microbiana e da formação de biofilmes é a utilização de procedimentos de higienização adequados, no entanto as superfícies de processamento de alimentos são locais potenciais para a formação de biofilmes, até mesmo quando programas de higiene e sanitização são aplicados (NORTEMANS, DORMANS, MEAD 1991).

Por isso, diversas pesquisas tem sido realizadas com o objetivo de encontrar alternativas para reduzir a adesão, umas destas alternativas tem sido a modificação da superfície dos materiais que entram em contato com alimentos, seja por meio da incorporação de antimicrobianos (THOUVENIN et al, 2003; GOTTENBOS et al, 2002) ou por modificação das propriedades físico-químicas (TRENTIN et al, 2014; PONCIN-EPAILLARD et al, 2013; HUNG et al, 2012).

Nas duas últimas décadas tem-se observado um grande avanço em técnicas para modificação de superfícies. Essas técnicas fazem uso de plasmas, *lasers*, feixes de íons e feixes de elétrons como fontes energéticas para alteração estrutural e/ou composicional da superfície, ou ainda para a deposição de filmes (ALVES Jr., 2001). Os materiais modificados superficialmente são aplicados numa variedade de áreas, principalmente na área da medicina e odontologia. Com relação à adesão microbiana, as alterações físicas são voltadas para modificações na hidrofobicidade das superfícies. Neste campo o tratamento de nitretação a plasma tem mostrado ser um método útil em muitos materiais, incluindo material orgânico, material inorgânico e metais, os quais podem ter a superfície modificada, alterando características como molhabilidade, permeabilidade, condutividade, adesão e biocompatibilidade (ARAÚJO et al, 2007).

2.4.1. Alteração de Superfícies Utilizando Nitretação a Plasma

O processo de nitretação a plasma (ou nitretação iônica) é um tratamento termoquímico que promove modificações na composição química das superfícies metálicas, alterando várias propriedades físicas, como dureza, resistência ao desgaste e a corrosão, resultando em um aumento da vida útil das peças tratadas (ARAÚJO et al, 2007). Esse processo consiste na geração de uma descarga elétrica em um gás contendo nitrogênio à baixa pressão, promovendo o bombardeio de íons e de espécies neutras sobre a superfície metálica, alterando algumas de suas propriedades como a energia livre da superfície, rugosidade e hidrofobicidade (ZHAO et al, 2008). A alteração da hidrofobicidade pode influenciar na adesão

bacteriana, sendo por isso motivo de estudos (PONCIN-EPAILLARD et al, 2013, HUNG et al, 2012; KIM et al, 2003).

Estes poucos estudos existentes têm demonstrado redução no número de microrganismos aderidos nas superfícies tratadas. Hung et al (2012) observaram redução no número de *Escherichia coli* aderidas á superfície de aço inoxidável AISI 303 utilizado em materiais médicos e odontológicos, após nitretação a plasma. Poncin-Epaillard et al (2013) também obtiveram redução no número de células de bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa e Hafnia alvei*), aderidas em polipropileno e poliestireno utilizados em materiais médicos, após o tratamento com plasma.

A nitretação a plasma apresenta vantagens sobre as demais técnicas de alteração de superfícies como um relativo baixo custo, pequeno impacto ambiental e aplicabilidade em diversos materiais. Este tratamento altera apenas as propriedades de superfície, mantendo as demais características dos materiais (TRENTIN et al, 2014).

Os resultados obtidos pelos recentes e escassos trabalhos realizados nesta área demonstram a promissora utilização deste tratamento e a necessidade de mais pesquisas com o objetivo de obter mais subsídios que permitam a implementação do tratamento a plasma na fabricação de materiais utilizados na confecção de equipamentos médicos, odontológicos e também para indústria de alimentos.

3. RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de três artigos científicos. Cada seção do capítulo de resultados da presente Tese corresponde a um desses artigos científicos.

3.1. “Adhesion of Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes on stainless steel welds”

Artigo publicado na *International Journal of Food Microbiology*.

3.2. Influence of free energy on the attachment of S. Enteritidis and L. monocytogenes to stainless steels AISI 304 and AISI 316

Artigo submetido para publicação no *Journal Food Research*.

3.3. Effect of plasma nitriding surface modification of stainless steels AISI 316 and 304 on the adhesion of food pathogens

Artigo submetido para publicação no periódico *Food Biophysics*.

3.1 ARTIGO 1

Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds

Letícia Sopeña Casarin^{a*}, Adriano Brandelli^a, Paulo Azevedo Soave^b, Cesar Henrique Wanke^b, Eduardo Cesar Tondo^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - ICTA/UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500 /43212, 91501-970 - Porto Alegre, Brasil.

^bInstituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 - Porto Alegre, Brasil.

* Corresponding author: Av. Bento Gonçalves, 9500 /43212, 91501-970 - Porto Alegre, Brasil. Tel: + 5551 3308 6677; fax: +5551 3308 7048

E-mail: lscasarin@gmail.com

ABSTRACT

Pathogenic microorganisms are able to adhere on equipment surfaces, being possible to contaminate food during processing. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* are important pathogens that can be transmitted by food, causing severe foodborne diseases. Most surfaces of the food processing industry are made of stainless steel joined by welds. However currently, there are few studies evaluating the influence of the welds in the microorganism's adhesion. Therefore the purpose of the present study was to investigate the adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on surface of metal inert gas (MIG), and tungsten inert gas (TIG) welding, as well as to evaluate the cell and surface hydrophobicity. Results demonstrated that both bacteria adhered to the surface of welds and stainless steel at same levels. Despite, bacteria and surfaces demonstrated different levels of hydrophobicity/hydrophilicity, results indicated that there was no correlation between adhesion to welds and stainless steel and the hydrophobicity.

1. INTRODUCTION

The adhesion of microorganisms to equipment surfaces has the potential to transmit pathogens to food, and this is a serious concern to food processing industry (Giaouris *et al.*, 2005). The surfaces of equipment used in food processing are recognized as one of the major sources of microbial contamination (Wong, 1998; Chmielewski and Frank, 2003). *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* are

important pathogenic bacteria, which can be transmitted by food. Numerous studies have shown that these bacteria are capable of adhering and form biofilms on metal, glass, polyethylene, and rubber surfaces (Bong Jae *et al.*, 2009; Chia *et al.*, 2009; Malheiros *et al.*, 2010; Tondo *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2011). Most surfaces of the food processing industry, such as machinery, pipelines, and working surfaces are made of stainless steel. This material is traditionally selected for food equipment because it is durable, resistant to corrosion, and it is easily cleaned (Holah and Thorpe 1990; Shi and Zhu, 2009). Due to their diverse projects and designs, food equipment frequently present corners and sharp angles, and the stainless steel plates are often joined by welds. Gas tungsten arc welding (GTAW), also called tungsten inert gas (TIG), and Gas metal arc welding (GMAW), sometimes referred as metal inert gas (MIG), are the conventional welding techniques used for food equipment fabrication and maintenance (Tide *et al.*, 1999; Lewan, 2014).

TIG welding is a process in which the joining of metal parts is produced by heating and melting of a non-consumable tungsten electrode arc, and the parts to be joined (EHEDG, 1993). The cost of the inert gas makes TIG welding more expensive than other stainless steel weldments, but it provides welds with very high quality and surface finish.

In MIG welding process electric arc is struck between a continuously fed wire and the metallic surface (EHEDG, 1993). The advantages of this process are: 1) easy operation, 2) high productivity, 3) the possibility of automation, 4) low cost, 5) no slag formation, resulting in a weld bead relatively well finished (EHEDG, 1993). However, there are several limitations in performing MIG welding, such as the needs of a complex regulation of the weld equipment; it cannot be performed in the

presence of flowing air, limited welding position, and allowance of extensive porosity in the weld bead (EHEDG, 1993). Also it produces frequent spills and the welds are difficult to maintain (O'Brien, 1991; Rao *et al.*, 2011). Welding process commonly provides greater roughness on stainless steel surfaces welded. Several studies have reported correlation between surface roughness and bacterial accumulation on surfaces (Wirtanen and Mattila-Sandholm 1992; Whitehead *et al.*, 2009). However, other studies have reported a lack of correlation between surface irregularities or roughness and the number of bacteria attached (Silva *et al.*, 2008; Szlavik *et al.*, 2012). In order to reduce the roughness caused by welding, stainless surfaces need to be ground and polished, achieving compliance with industry surface roughness standards.

Beyond the surface roughness, other factors may influence microorganism adherence to surfaces, such as surface properties (electric charge and hydrophobicity), the microorganism characteristics (hydrophobicity, electric charge, production of extracellular substances), and environmental factors (pH, temperature, nutrients, etc.) (Hood and Zottola, 1997; Sinde and Carballo, 2000, Araújo *et al.*, 2009). Currently, there are few studies evaluating the adherence of microorganisms on welds, and many doubts still exist concerning which is the most suitable weld to be used in food equipment. Therefore, the purpose of the present study was to investigate adhesion of *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* on the surface of MIG and TIG welds and also to evaluate the influence of both cells and weld surface hydrophobicity in the bacterial attachment.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Bacterial Strains

In this study, two bacterial strains previously isolated by the Laboratory of Microbiology and Food Control of Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil) were used: *S. Enteritidis* (SE86) isolated from cabbage involved in a foodborne outbreak occurred in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, and *L. monocytogenes* (J11) isolated from a bovine slaughterhouse of the State of RS, Brazil.

Before each experiment, *S. Enteritidis* was cultivated in Brain Infusion Broth - BHI (OXOID, Basingstoke, England) at 37° C for approximately 18 h and the *L. monocytogenes* was grown in BHI with 0.6% yeast extract (OXOID, Basingstoke, England), incubated at 37°C for approximately 30 h, both were diluted to 10⁵ CFU/ml using 0.1% peptone water (OXOID, Basingstoke, England) for artificial contamination of stainless steel coupons.

2.2. Preparation of coupons

Stainless steel coupons (2cm x 2cm and 0.2cm) joined with MIG or TIG welds were kindly provided by Sulmaq Equipamentos™ (Sulmaq, Guaporé, Brazil). Welds were carried out on the transversal central area of each coupon (Figure 1), and 12 coupons joined by MIG weld (6 polished and 6 unpolished) and 12 coupons joined by TIG weld (6 polished and 6 unpolished) were used. Coupons (n=6) without any weld were prepared in order to be used as control. The technical characteristics of coupons are described in Table 1. Prior to bacterial adhesion assays, the coupons were immersed in a solution of detergent, rinsed with distilled water and sprayed with

70% ethanol in order to remove grease. Then the coupons were autoclaved at 121°C for 15 min and dried at 60°C for 2 h (adapted from Rossoni and Gaylarde, 2000). The coupons were kept in sterile Petri dishes, and remained at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) until the time of testing.

2.3. Contamination of coupons and evaluation of bacterial adhesion

The coupons were immersed in 100 ml of BHI broth (Oxoid, Basingstoke, UK) containing each bacterial culture at a concentration of 10^5 CFU/ml, kept at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Six coupons of each kind of weld were immersed in the culture of each microorganism during the following times: 0, 1 and 4 h (adapted from Kusumaningrum *et al.*, 2003). After that, coupons were rinsed with 1 ml of sterile distilled water to remove the weakly adhered cells. The coupons were subsequently immersed in 25 ml of 0.1 % peptone water (Oxoid) and immediately treated in ultrasonic bath - sonicator (Unique Group, Indaiatuba, Brazil), in order to remove adhered cells (Sinde and Carballo, 2000). Two decimal dilutions of this solution containing the cells of each treated coupon were prepared (10^{-1} and 10^{-2}). Then 20 μl of each dilution were plated on Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid) and on TSA added with 0.6 % of yeast extract (Oxoid). Plates of TSA were used to count *S. Enteritidis*, while TSA containing 0.6% yeast extract were used to enumerate *L. monocytogenes*. Enumerations were carried out by the drop method (Milles and Misra, 1938). TSA plates were incubated at 37°C for 18 h and 30 h for *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes*, respectively. Stainless steel coupons without welding (control) were submitted to the same procedure described above.

In parallel with each assay, decimal dilutions were prepared in order to determine the amount of cells in the suspensions used for immersion of the coupons. After, 20 µl of these dilution were plated on TSA and TSA with 0.6% of yeast extract (to *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes*, respectively by the drop method (Milles and Misra, 1938) and were incubated at 37°C for 18 h and 30 h for *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes*, respectively, and then colonies were enumerated.

The experiments were performed in duplicate and each experiment was repeated three times.

2.4. Scanning Electron Microscopy

The coupons with adhered cells were fixed with 12 % (v/v) glutaraldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) for 7 days, and washed with 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2±0.2). After, the samples were dehydrated with increasing concentrations of acetone (Labsynth, Diadema, Brazil) in 30 to 100% with a range of 10 to 20 min. After drying at room temperature (25 ± 1°C), the samples were subjected to critical point drying in liquid CO₂ in the equipment Balzers (Balzers Union Ltd, Balzers, Liechtenstein) then, the samples were coated with gold in Balzers equipment (Balzers) (Tondo *et al.*, 2010). After coating, the samples were observed in a scanning electron microscope Jeol 6060 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) at the Electron Microscopy Center of Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil).

2.5. Evaluation of Materials hydrophobicity

Contact angle measurements were carried in order to determine the surface hydrophobicity as described by Van Oss (1995). The surface hydrophobicity is

determined as the free energy of interaction between molecules (i) immersed in water (w) and can be expressed as ΔG_{wi}

$$\Delta G = -2\gamma_{sL} \quad (1)$$

Where γ_{sL} is the interfacial tension between the interface of the surface and water, is given by the following equation:

$$\gamma_{sL} = \left(\sqrt{\gamma_s^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}} \right)^2 + 2 \left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_L^-} \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} \right) \quad (2)$$

To calculate the interfacial tension, contact angle measurements were made using two polar solvents: water and formamide (Vetec – Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Brazil) and one nonpolar solvent: α -bromonaphthalene (Vetec – Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Brazil), according to the recommendations of van Oss (1995), using a goniometer (Krus DSA30, Hamburg, Germany). The contact angle measurements were used to determine the Lifshitz-van der Waal compound of the surfaces (γ_s^{LW}), the electron acceptor parameter of the polar surface tension component (γ_s^+) and the electron donor parameter of the polar surface tension component γ_s^- .

$$(1 + \cos\theta)\gamma_L = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_s^-} \right) \quad (3)$$

The surface tension parameters for the apolar and polar liquids used in the calculations are given in Table 2. The interfacial tension was calculated using the surface tension parameters for the surface and the polar and apolar solvents using the following equation:

$$\gamma_L = \gamma_{sL}^{LW} + \gamma_{sL}^{AB} \quad (4)$$

Where γ_{sL}^{LW} is the apolar Lifshitz-van der Waal compound of the surface and the liquid and γ_{sL}^{AB} is the Lewis acid base compound of the surface and the liquid.

The Lifshitz-van der Waal compound and the Lewis acid base compound were calculated using the surface tension parameters calculated by Eq.(3) and are given in Table 2.

The surface hydrophobicity was calculated based on four experimental measurements giving a total of eight contact angle estimates (left and right angle of the droplet) and presented as the mean \pm standard deviation for each measured value.

2.6. Evaluation of cell hydrophobicity

To measure the contact angles of the cell surface the measurements on a layer of vegetative cells using the drops method described by Busscher *et al.* (1984) were performed. First, cells were cultivated in BHI (Oxoid) broth and BHI broth with 0.6% of yeast extract (Oxoid) to cells of *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes*, respectively, in order to obtain a suspension of 30 ml of each culture with approximately 10^8 CFU/ml. Subsequently, the suspension was centrifuged at 12,000 *g* for 10 min and then washed three times in phosphate buffered saline (PBS). The cell pellet was re-suspended in the same buffer being deposited on a filter membrane of cellulose acetate with pore size of 0.45 μm (Sartorius, Goettingen, Germany) by filtration using negative pressure.

The membranes were placed in a Petri dish containing agar-agar Type I (Himedia Laboratories, Mumbai, India) and glycerol (CAQ – Casa da Química, Diadema, Brazil), where were kept to dry for 1 h at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Immediately, membranes were cut into three strips with 1 cm and then 5.0 μl drops of each solution (water, formamide and α -bromonaphthalene) and placed on the

bacteria layer (Busscher *et al.*, 1984; Araújo *et al.*, 2009). Measures of four drops on each surface were performed using a goniometer (Krus DSA30, Hamburg, Germany) and the average of these measurements was considered as a result. The calculation of the interfacial tension was performed as described above, for evaluation of materials hydrophobicity.

2.7. Statistical analysis

For statistical evaluation of the data obtained in adhesion tests (CFU/mL and CFU/cm² to cells in suspension and adhered cells, respectively), values were converted to log₁₀ colony-forming units. In all cases duplicate samples were used and the experiment repeated at least three times. Analysis of variance was performed using the GLM (general linear model), with the SPSS software version 18.0. The Turkey's Test was used to compare the averages and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

The adhesion of *Salmonella* Enteritidis on MIG and TIG welds is illustrated in Figure 2. It can be observed that adhesion occurred in both surfaces and the cells tend to form clusters.

The results presented in Figure 3 demonstrate that there are no significant differences between the two types of welding (MIG and TIG) for adhesion of *S. Enteritidis* (SE86) and *L. monocytogenes* (J11). Also, no significant differences between the polished and unpolished welds were observed for *S. Enteritidis* (SE86) and *L. monocytogenes* (J11) adhesion.

In addition, no significant differences were observed in adherence of *S. Enteritidis* (SE86) and *L. monocytogenes* (J11) on the welded surfaces (MIG and TIG) and not welded surfaces used as controls (stainless steel without welds). Results also revealed that *S. Enteritidis* (SE86) initially adhered (time 0) significantly more than *L. monocytogenes* (J11) on all materials, and there is significant difference ($P < 0.05$) between contact times for all welds.

The hydrophobicity (ΔG_{wi}) of the investigated surfaces was determined based on contact angle measurements (Table 3). Surfaces are considered hydrophobic when $\Delta G_{\text{wi}} < 0$, and hydrophilic when $\Delta G_{\text{wi}} > 0$ (van Oss, 1995). Further, when the water contact angle is $< 50^\circ$ the surface is considered hydrophilic, whereas the surface is considered hydrophobic when the angle is $> 50^\circ$ (van Oss and Giese, 1995). According to the data presented in Table 3, only the bacteria had a water contact angle $< 50^\circ$ and a positive ΔG_{wi} value and thus present hydrophilic characteristics. Values obtained for bacteria were significantly different from the weld surfaces ($P < 0.05$), which are all hydrophobic.

4. DISCUSSION

The results of this work show that *Salmonella* Enteritidis is able to adhere to stainless steel surface and welds at a rate of about $3 \log_{10}$ CFU/cm², considering an initial artificial contamination of $5 \log_{10}$. These results are in agreement with findings by Bae *et al.*, 2012 and Chia *et al.*, 2009, who had demonstrated the same adhesion rate of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* to stainless steel.

L. monocytogenes J11 also adhered to stainless steel and welds, but at initial rates significantly lower than *S. Enteritidis* SE86. Similar results were found by

Stepanovic *et al.* (2004), evaluating biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on plastic surfaces. The number of attached *L. monocytogenes* ranged between 10^2 and 10^3 CFU/cm². Same levels of adherence of *L. monocytogenes* to glass surfaces were observed by Chae and Schraft (2000).

Results of the present study also revealed that there is significant difference ($P < 0.05$) between adhesion on different contact times for all welds, and that *S. Enteritidis* SE86 demonstrated the largest numbers of adhered cells after 1 h of contact with the surfaces. *L. monocytogenes* had demonstrated the same levels of adherence only after 4 h. The higher adhesion levels showed by *Salmonella* spp. than that by *L. monocytogenes* could be explained by the superiority of Gram-negative bacteria to form biofilm on inert surfaces (Sommer *et al.*, 1999; Pompermayer and Gaylarde, 2000).

Unlike to expectations, results shown in this work demonstrated that there were no significant differences in adhesion levels between the two types of welding (MIG and TIG) for *S. Enteritidis* (SE86) and *L. monocytogenes* (J11). These results were observed despite the very distinctive appearance of MIG and TIG welds. TIG welds present a surface with a distinct undercut, maintaining an acceptable surface roughness, whereas MIG welds had a surface lifted and very poor surface finish. Moreover, polished welds exhibited surfaces with smooth profile and unpolished welds had irregular surfaces.

The MIG and TIG welds also exhibit significant differences in the values of roughness (Table 1) between the polished and unpolished surfaces, and both showed mean surface roughness values higher than 1.0 maximum Ra value defined by New Zealand's Code of Practice for Dairy Food Manufacturing (New Zealand

Dairy Industry Manual, 1995) and 0.8 Ra maximum values defined by the Dairy German Standard – DIN 11480 (DIN, 1978).

Our results showed no relation between bacteria adhesion and the Ra values. Flint (1996) also found no correlation between surface roughness, the presence or absence of welds, and the attachment of a heat-resistant *Streptococcus* responsible for spoilage problems in dairy manufacturing plants. The lack of correlation between surface roughness and adhesion of *Listeria monocytogenes* in different weld surfaces was also described by Tide *et al.* (1999).

In one of the few studies concerning bacterial colonization on welded material, Walsh *et al.* (1993) have presented evidences that initial bacterial attachment was random, but that colonies formed more frequently and developed more rapidly at the attached zones than on parent metal surfaces. Based on these independent observations, welds have been proposed to be sites for preferential bacterial accumulation and entrapment (Notermans *et al.*, 1991). However, the present study demonstrated no significant differences in adherence levels between the welded surfaces (MIG and TIG) and not welded surfaces (stainless steel without welds) to *S. Enteritidis* (SE86) and *L. monocytogenes* (J11). Similar results were observed by Tide *et al.* (1999), when assessing the adhesion of *L. monocytogenes* to welded and not welded surfaces and observed no significant differences between the density of bacterial cells associated with the weld and adjacent parent metal surface. The same authors have also demonstrated that *L. monocytogenes* and the 3-species consortium composed by bacteria recovered from stainless steel weldments in a seafood processing plant, colonized the unpolished surface of different welds and the parent metal (stainless steel without weld), even when these welds had scratches

and pits (Tide *et al.*, 1999). Similar behavior was observed in our study through the images of scanning electron microscopy (Figure 2), where it was observed that the bacteria adhered similarly in all areas of the coupons.

When the cell and materials surface hydrophobicity were investigated, we observed that the bacteria were hydrophilic and all surfaces were hydrophobic. Despite the different levels of hydrophobicity/hydrophilicity there was no relation between adhesion and the surface hydrophobicity. This is in agreement with the results of Silva *et al.* (2008) and Mafu *et al.* (1990), carried out under static conditions, and also with Slavick *et al.* (2012), which was accomplished under liquid flow conditions.

4.1. Conclusions

Our results demonstrated that both bacteria adhered to the surface of welds and stainless steel at same levels and demonstrated the similar patterns during four hours of contact. Further, the type of welding, its polishing and roughness did not influence on the bacterial adhesion. The hydrophobicity of cells and materials did not demonstrate a positive relation with the bacterial adherence, indicating that the adhesion process is likely to involve other physicochemical and/or biological factors not investigated by the present study.

5.ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) of Brazil and the Sulmaq Company for kindly providing the weld coupons.

REFERENCES

1. Araújo, E.A; Bernardes, P.C.; Andrade de, N.J.; Fernandes, P.E; Sá de, J.P.N. (2009). Hidrofobicidade de ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. *Alimentos e Nutrição*, 20 (3), 491-497.
2. Bae, Y.; Baek, S; Lee, S. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 465–473.
3. Bong Jae, P.; Travis, H.; Nehal, I. A. (2009). A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: An atomic force microscopy study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 237-243.
4. Busscher, H. J. et al. (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. *Applied Environmental Microbiology*, 48 (5), 980-983.
5. Chae, M.S. and Schraft, H. (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology* 62, 103–111.
6. Chia, T.W.R.; Goulter, R.M.; Mcmeekin, T.; Dykes, G.A.; Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26, 853–859.
7. Chmielewski, R.A.N. and Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and in food processing facilities. *International Journal of Food Science and Technology*. 2 (1), 22-32.
8. DIN 11480 (1978). Milk processing machinery in dairy processing plants surfaces. Berlin, Koln: Beuth Verlag.
9. EUROPEAN HYGIENIC ENGINEERING & DESIGN GROUP - EHEDG (1993). Welding stainless steel to meet hygienic requirements. *Trends in Food Science & Technology*, 4, 306-310.
10. Flint, S.H. (1996). Report on an evaluation of seven plasma weld samples. In W. Scholz, *Stainless steel weld surface finish and biofilm development. Around robin test*, New Zealand Welding Center Report R8-14, (Section 5, pp. 1-7). Manukau City, New Zealand.
11. Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E. (2005). Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation *Salmonella enteritidis* PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *Journal of Food Protection* 68, 2149-2154.
12. Holah, J.T., Thorpe, R.H. (1990). Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology* 69 (4), 599 - 608.

13. Hood, S. K.; Zottola, E. A. A. (1997) Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37 (2/3), 145-153.
14. Kusumaningrum, H. D.; Riboldi, G.; Hazeleger, W.C.; Beumer, R.R. (2003) Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 83 (3), 227-236.
15. LEWAN, M. (2014). *Hygiene in Food Processing* (2 ed.), Cambridge: Woodhead Publishing Limited. p. 142–154.
16. Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection* 53, 742–746.
17. Malheiros, P. da S.; Passos, C.T.; Casarin, L.S.; Serraglio, L.; Tondo, E.C. (2010). Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces on stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*, 21, 298-301.
18. Milles, A. A.; Misra, S. S. (1938). Estimation of the bactericide power of the bloods. *Journal of Hygiene*, 38, 732-749.
19. Morita, Y.; Komoda, E.; Ono, K.; Kumagai, S. (2011). Survival of biofilm-forming *Salmonella* on stainless steel bolt threads under dry conditions. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 52 (5), 299 - 303.
20. New Zealand Dairy Industry Manual (1995). NZCP6: Design and layout of manufacturing premises. Section 8: General Requirements for Equipment (page 8.5, Subsection 8.3.2 Surface Finish). New Zealand Dairy Board, New Zealand.
21. Notermans, S.; Dormans, J.A.M.A.; Mead, G.C. (1991). Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants. *Biofouling*, 5, 21-36.
22. O'Brien, R.L. (1991) *Welding process*, in *Welding Handbook*, (8th ed., vol. 2). Miami: American Welding Society, USA.
23. Pompermayer, D.M.C. and Gaylarde, C.C. (2000) The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*, 17, 361–365.
24. Rao, Z.H.; Liao, S.M.; Tsai, L.H. (2011) Modelling of hybrid laser-GMA welding: review and challenges. *Science and Technology of Welding and Joining*, 16, 300-305.
25. Rossoni, E.M.M. and Gaylarde, C.C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food

- processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 81-85.
26. Shi, X. and ZHU, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Food Science and Technology*, 20, 407-413.
 27. Silva, S.; Teixeira, P.; Oliveira, R.; Azeredo, J. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 71, 1379–1385.
 28. Sinde, E. and Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* sp. And *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17 (4), 439-447.
 29. Sommer, P.; Martin-Rouas, C.; Mettler, E. (1999). Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiology*, 16, 503–515.
 30. Stepanovic, S.; Cirkovic, I.; Ranin, L.; Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 38, 428–432.
 31. Szlavik, J.; Paiva, D.S.; Mørk, N.; van den Berg, F.; Verran, J.; Whitehead, K.; Knöchel, S.; Niels, D.S. (2012). Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 181-188.
 32. Tide, C.; Harkin, S.R.; Geesey, G. G.; Bremer, F. J.; Scholz, W. (1999). The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. *Journal of Food Engineering*, 42, 85 -96.
 33. Tondo, E.C.; Machado, T. R. M.; Malheiros, P. S.; Padrão, D. K.; de Carvalho, A. L.; Brandelli, A. (2010). Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4), 1027-1037.
 34. van Oss, C.J.; Giese, R.F.; Costanzo, P.M. (1990). DLVO and non-DLVO interactions in hectorite. *Clays and Clay Minerals*, 38, 151–159.
 35. van Oss, C.J. and Giese, R.F. (1995). The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays and Clay Minerals*, 43, 4747-477.
 36. van Oss, C.J. (1995). Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5, 91–11.
 37. Walsh, D.; Pope, D.; Danford, M.; Hu, T. (1993). The effect of microstructure on microbially influenced corrosion. *Journal of Mineral, Metal and Material Society*, 45(9), 22-30.

38. Whitehead, K.A.; Benson, P.; Smith, L.A.; Verran, J. (2009). The use of physicochemical methods to detect organic food soils on stainless steel surfaces. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 25, 749-756.
39. Wirtanen, G. and Mattila-Sandholm, T. (1992). Removal of foodborne biofilms - comparison of surface and suspension tests. Part I. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 25(1), 43-49.
40. Wong, A.C. (1998). Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science*, 81, 2765–2770.

Table 1: Materials used in the assays and their characteristics.

Welding Type/ Sample	Treatment	Roughness
Identification		(Ra)*
MIG 07	unpolished	4.72
MIG 13	polished	1.69
TIG 21	unpolished	4.92
TIG 31	polished	1.72

*Roughness (Ra) was determined by the welds supplier, using roughness tester.

Table 2: Surface tension parameters for polar and apolar liquids used to calculate the physicochemical parameters (in mJm⁻²) (van Oss et al., 1990).

Liquid	γ_L	γ_L^{LW}	γ_L^+	γ_L^-
Water	72.8	21.8	25.5	25.5
Formamide	58	39	2.28	39.6
α -Bromonaphthalene	44.4	44.4	0	0

Table 3: Water contact angle (in degrees) of the cells and surfaces with their respective hydrophobicity parameters (ΔG_{iwi}).

Surface	Water contact angle	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-	ΔG_{iwi} (MJ. m ⁻²)
<i>L. monocytogenes</i>	27.8±2	42.12±1.6	0.44±0.2	47.80±3.6	26.04±3.2
<i>S. Enteritidis</i>	23.4±3	41.97±2.0	0.71±0.1	48.78±3.8	25.98±3.1
MIG Weld unpolished	71.5±3	39.04±0.5	0.08±0	11.67±2.2	-36.03±4.2
MIG Weld polished	65.4±5	41.44±0.7	1.48±0.5	9.22±2.1	-37.09±3.9
TIG Weld unpolished	49.9±6	42.27±1.3	1.02±0.3	23.29±3.1	-10.31±1.0
TIG Weld polished	75.6±3	40.27±1.1	0.31±0.1	6.60±1.0	-50.12±7.8

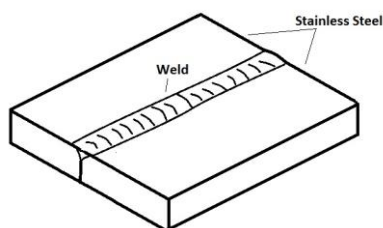


Figure 1: Schematic drawing of weld coupon.

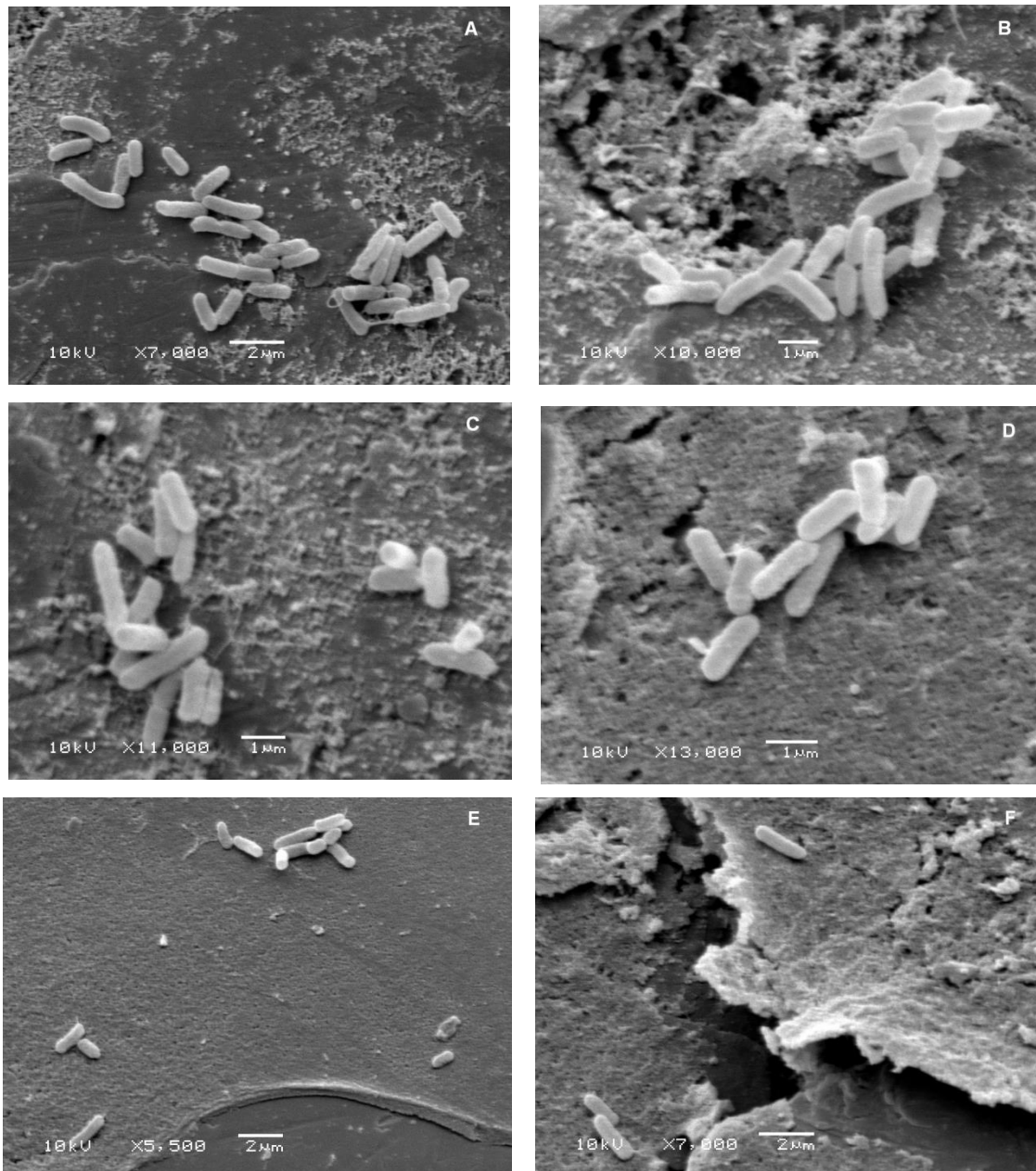


Figure 2: Representative scanning electron micrographs, showing the adherence of *S. Enteritidis* (SE 86) on MIG polish welds (A, B and C) and on TIG unpolished welds (D, E and F), after 1 h of contact.

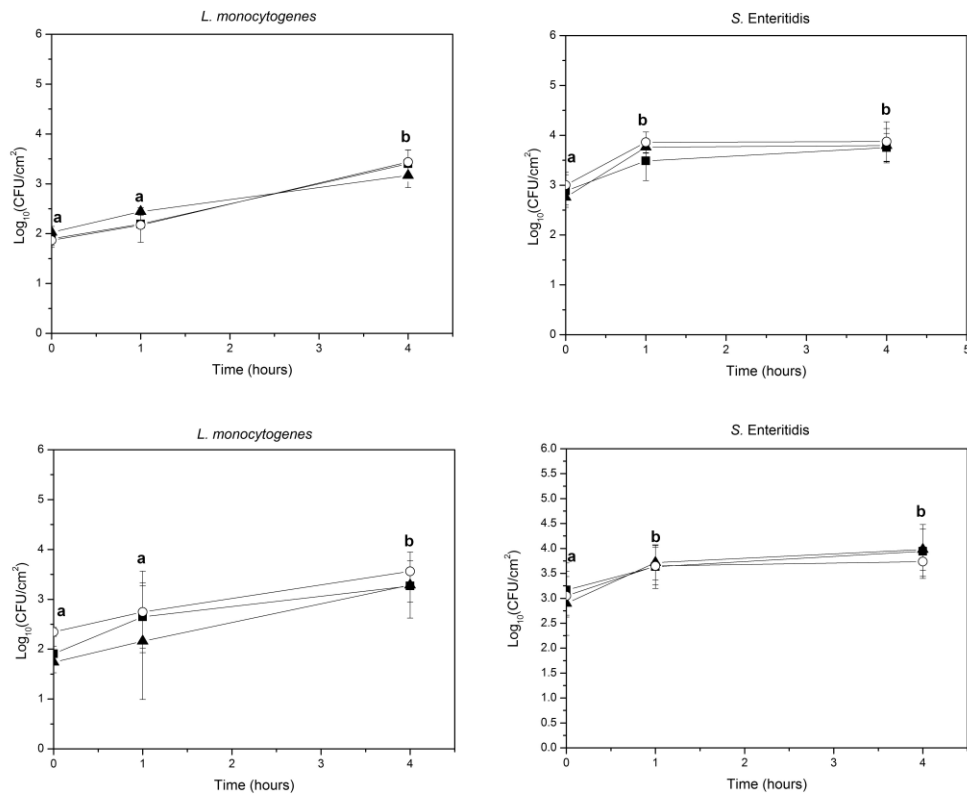


Figure 3: *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* adhesion to stainless steel without welding (■) and welds: unpolished MIG welds (▲), polished MIG welds (△) unpolished TIG welds (●) and polished TIG welds (○) after 0, 1 and 4 h of contact.

3.2. ARTIGO 2

Influence of free energy on the attachment of *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* to stainless steels AISI 304 and AISI 316

Letícia Sopeña Casarin^{a*}, Fabrício de Oliveira Casarin^b; Adriano Brandelli^a, Sukarno Olavo Ferreira^d, Júnia Novello^{ac}, Eduardo Cesar Tondo^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - ICTA/UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500 /43212, 91501-970 - Porto Alegre/RS, Brasil.

^bPrograma de Pós Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 - Porto Alegre/RS, Brasil.

^cCentro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul – UCS. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - CEP 95070-560 - Caxias do Sul/RS, Brazil.

^dDepartamento de Física, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitário, CEP: 36570-900, Viçosa/MG, Brazil.

* Corresponding author: Av. Bento Gonçalves, 9500 /43212, 91501-970 - Porto Alegre, Brasil. Tel: + 5551 3308 6677; fax: +5551 3308 7048

E-mail: lscasarin@gmail.com

ABSTRACT

The quality of products produced by food industries is threatened when bacteria attached to and grow on stainless steel used in food equipments. The adhesion of bacteria to the surface is the first stage in this process and can enable subsequent microbial proliferation and release. Stainless steels AISI (American Iron and Steel Institute) 304 and AISI 316 are the most used in the manufacture of various types of equipment for the food industry. The purpose of the present study was to investigate the attachment of a Gram-negative (*Salmonella* Enteritidis) and a Gram-positive (*Listeria monocytogenes*) food pathogens on this stainless steels, and also to evaluate the influence of the material topography and the hydrophobicity of the material surfaces and cells in the attachment process. Moreover, this study also aimed to evaluate the free energy of interaction between cells and surfaces. The topography was evaluated using Atomic Force Microscopy (AFM), while hydrophobicity and free energy of interaction was determined by measuring of the contact angle, using the Thermodynamic Theory. Results demonstrated that both bacteria were able to adhere on stainless steels AISI 304 and AISI 316. At the beginning of contact time between cells and surfaces, higher numbers of cells of *S. Enteritidis* adhered to the surfaces, and the adhesion of this microorganism was thermodynamically more favorable than the adhesion of *L. monocytogenes* to both stainless steels. A similar patterns of adhesion was observed for both stainless steels with respect to the number of adhered cells, however the stainless steel AISI 316 had more negative total energy of adhesion for both bacteria. Moreover the surfaces roughness and hydrophobicity of cells and materials did not demonstrate a positive correlation with the bacterial adherence.

Key words: stainless steel, bacterial adhesion, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis

1. INTRODUCTION

Contamination of food by microorganisms during processing is of great concern to the food industry because of their potential to spread disease and induce spoilage. A common route of food contamination, for pathogenic bacteria is through contact of the product being processed with contaminated processing equipment (Sasahara & Zottola, 1993). Numerous studies have shown differences between adherence patterns of Gram-negative and Gram-positive bacteria (Pompermayer & Gaylarde, 2000; Sommer *et al.*, 1999). *S. Enteritidis* is an important Gram-negative food pathogen, responsible for thousands of outbreaks worldwide (European Food Safety Authority (EFSA), 2010). Moreover *L. monocytogenes* has been recognized as major Gram-positive foodborne pathogens worldwide in recent years, and its ability to forming biofilms on food surfaces is well recognized (Pan, Breidt & Gorski, 2010; Gandhi & Chikindas, 2007; Wilks, Michels & Keevil, 2006). Several studies have shown that these bacteria are capable of adhering and form biofilms on stainless steel, glass, polyethylene and rubber surfaces (Bong Jae, Travis & Nehal, 2009; Chia *et al.*, 2009; Malheiros *et al.*, 2010; Tondo *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2011). Many equipment surfaces of the food processing industry are made of stainless steel. This material has been traditionally chosen because it is durable, resistant to corrosion, and it is easily cleaned (Holah & Thorpe 1990; Shi & Zhu, 2009). Stainless Steel AISI (American Iron and Steel Institute) 304 and AISI 316 are the most used stainless steel types in the manufacture of various equipment for the food industry (EHEDG, 2007; Hood & Zootola, 1997). The alloy AISI 304 is austenitic steel with a minimum

of 18% chromium, 8% nickel and up to 0.08% carbon, and the alloy AISI 316 is also austenitic steel, with molybdenum up to 3% and higher nickel content (10–14%) of type 304 (Martins, Moreira & Martins, 2014). What essentially distinguishes the type 316 from the type 304 is the addition of molybdenum up to about 3%. The molybdenum increases the corrosion resistance of this alloy in various environments (brines, bleaching, biofluids, etc.), and, in particular, reduces or inhibits the pitting corrosion induced by the chlorides (Martins, Moreira & Martins, 2014). Despite this chemical resistance, the higher cost of type AISI 316, makes this steel less used in the manufacturing of equipment for food, so the type AISI 304 stainless steel has been the most widely used by manufacturers of equipment for food industry.

The adhesion of bacteria to the surface equipment is particularly affected by the physicochemical characteristics of the microorganisms and the materials surface involved (Teixeira *et al.*, 2005). When bacteria approach a surface they must overcome an energy barrier to establish direct contact with the surface. The repulsive or attractive forces consist of Lifshitz–van der Waals attractive forces, electrostatic repulsive forces and acid base forces. As an oversimplified rule of thumb, primary adhesion between bacteria and abiotic surfaces is generally mediated by nonspecific interactions (Dunne, 2002). Only when the cell and surfaces are in close proximity the short-range interactions become significant (including hydrogen bonding as well as hydrophobic interactions). The theoretical approaches for describing these interactions usually involve DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek) or XDLVO (Extended DLVO) (van Oss, 2003; van Oss, Chaudhury & Good, 1988). This theories has been applied in investigations of bacterial adhesion on surfaces, in controlled environments, by taking into account the surface contact angle, roughness

and surface charge, as well as the bacteria cell wall properties (Szlavik *et al.*, 2012; Subramani & Hoek, 2008; Teixeira *et al.*, 2005, Sinde & Carballo, 2000).

Therefore, the purpose of the present study was to investigate the influence of free energy on the attachment of *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* to stainless steels AISI 304 and AISI 316.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial Strains

In this study, two bacterial strains previously isolated by the Laboratory of Food Microbiology and Food Control of Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil) were used: *S. Enteritidis* (SE86) isolated from a cabbage involved in a foodborne outbreak occurred in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, and *L. monocytogenes* (J11) isolated from a bovine slaughterhouse located at the same State.

Before each experiment, *S. Enteritidis* was cultivated in Brain Infusion Broth - BHI (OXOID, Basingstoke, England) at 37° C for approximately 18 h and *L. monocytogenes* was grown in BHI supplemented with 0.6% yeast extract (OXOID, Basingstoke, England), incubated at 37°C for approximately 30 h. After cultivation, both microorganisms were diluted to 10⁵ CFU/ml using 0.1% peptone water (OXOID, Basingstoke, England) for artificial contamination of stainless steel coupons.

2.2 Preparation of coupons

Stainless steel AISI 304 and AISI 316 mechanically brushed polished, also known as number 4 finish were kindly provided by Metalúrgica Ralf Winter™ (Ralf Winter, Alvorada, Brazil). Prior to bacterial adhesion assays, stainless steel were cut into coupons with dimensions of 2cm x 2cm and 0.2cm and immersed in a solution of neutral detergent, rinsed with distilled water and immersed in 70% (v/v) ethylic alcohol in order to remove grease. Then the coupons were autoclaved at 121°C for 15 min and dried at 60°C for 2 h (adapted from Rossoni & Gaylarde, 2000). The coupons were kept inside sterile Petri dishes and remained at room temperature (25 ± 1°C) until the time of testing.

2.3 Contamination of coupons and evaluation of bacterial adhesion

The coupons were immersed in 100 ml of BHI broth (Oxoid, Basingstoke, UK) containing each bacterial culture at a concentration of 10⁵ CFU/ml, kept at room temperature (25 ± 1°C). Six coupons of each kind of stainless steel were immersed in the culture of each microorganism during the following times: 0, 1, 2, 4, 6 and 8 h (adapted from Kusumaningrum *et al.*, 2003). After that, coupons were rinsed with 1 ml of sterile distilled water in order to remove weakly adhered cells. The coupons were subsequently immersed in 25 ml of 0.1 % peptone water (Oxoid) and immediately treated with ultrasonic bath - sonicator (Unique Group, Indaiatuba, Brazil), aiming to remove adhered cells (Sinde & Carballo, 2000). Two decimal dilutions of this solution containing the cells of each treated coupon were prepared (10⁻¹ and 10⁻²). Then 20 µl of each dilution were plated on Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid) and on TSA added with 0.6 % of yeast extract (Oxoid). Plates of TSA were used to count *S. Enteritidis*, while TSA containing 0.6% yeast extract were used to count *L. monocytogenes*. Enumerations were carried out by the drop method (Milles

& Misra, 1938). TSA plates were incubated at 37° C, for 18 h, and 30 h for *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* cultivation, respectively.

In parallel with each assay, decimal dilutions were prepared in order to determine the amount of cells in the suspensions used for immersion of the coupons. After, 20 µl of these dilution were plated on TSA and on 0.6% yeast extract TSA (for *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* enumeration, respectively) by the drop method (Milles & Misra, 1938) and were incubated at 37°C, for 18 h, and 30 h for *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* cultivation, respectively, and then colonies were enumerated.

The experiments were performed in duplicate and each experiment was repeated three times.

2.4 Scanning Electron Microscopy

The coupons with adhered cells were fixed with 12 % (v/v) glutaraldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) for 7 days, and washed with 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2±0.2). After, the samples were dehydrated with increasing concentrations of acetone (Labsynth, Diadema, Brazil) of 30 to 100% with a range of 10 to 20 min. After drying at room temperature (25 ± 1°C), the samples were subjected to critical point drying in liquid CO₂ and were coated with gold in the Balzers equipment (Balzers Union Ltd, Balzers, Liechtenstein) (Tondo *et al.*, 2010). After coating, the samples were observed in a scanning electron microscope Jeol 6060 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) at the Electron Microscopy Center of Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil).

2.5 Hydrophobicity and free energy of adhesion

Bacterial hydrophobicity was measured by the contact angle method as described by Busscher *et al.* (1984). Bacteria suspensions (10^8 CFU/ml) were washed three times with phosphate buffered saline solution (PBS) was filtered on 0.45mm pore diameter filters (Sartorius, Goettingen, Germany). Filters with bacteria were maintained for 1 hour in Petri dishes containing 1% (w/v) agar-agar Type I (Himedia Laboratories, Mumbai, India) with 10% (v/v) glycerol (CAQ – Casa da Química, Diadema, Brazil) to establish constant moisture content. Filters were then transferred to microscope glass slides. Five-microliters drops of two polar solvents: water and formamide (Vetec – Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Brazil) and one nonpolar solvent: α -bromonaphthalene (Vetec – Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Brazil) were deposited on bacterial layer, using a goniometer (Krus DSA30, Hamburg, Germany), according to the recommendations of van Oss (1995).

Hydrophobicity of the materials was estimated by the same technique, using the measurement of the contact angle formed by the three solvents with different polarities on the surface of stainless steels. Measures of four drops on each surface or bacteria were performed and the average of these measurements was considered as a result.

Bacteria and material surfaces free energies (ΔG_{iwi}) were obtained by calculating the surface tension components of the material (cells or stainless steel), which was obtained from the contact angle of the three liquids, using the tables reported by van Oss *et al.* (1990), according to the following equation (van Oss, 1995):

$$(1 + \cos\theta)\gamma_1^{TOT} = 2\left(\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_1^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_1^+\gamma_s^-}\right) \quad (1)$$

Where, θ is the contact angle, $\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$, and γ^{LW} is the Lifshitz–van der Waals component of the surface free energy and γ^+ and γ^- are the electron acceptor and electron donor parameters, respectively.

According to the Thermodynamical analysis reported by Teixeira *et al.* (2005), when studying the interaction between substances 1 and 2 that are immersed or dissolved in water (w), the total interaction energy ΔG_{1w2}^{TOT} ; can be expressed as:

$$\Delta G_{1w2}^{TOT} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_{1w}^{LW} - \gamma_{2w}^{LW} + \left[\sqrt{\gamma_w^+}(\sqrt{\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_w^-}) + \sqrt{\gamma_w^-}(\sqrt{\gamma_1^+} + \sqrt{\gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_w^+}) - \sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+} \right] \quad (2)$$

In this case, 1 represents the support material (stainless steel) and 2 the bacteria. Thermodynamically, if $\Delta G_{1w2}^{TOT} < 0$ adhesion is favorable, on the contrary, adhesion is not expected to occur if $\Delta G_{1w2}^{TOT} > 0$ (Teixeira *et al.*, 2005).

2.6 Analysis of stainless steel topography using atomic force microscopy

Surfaces topography of stainless steels was evaluated using atomic force microscope (AFM). First, each sample was cleaned as described in the previous section (2.2), and coupons were stored inside a desiccator until analyses. Coupons were then observed on a NT-MDT Ntegra Prima atomic force microscope (NT-MDT™, Moscow, Russia) at the Institute of Physics of Federal University of Viçosa, Viçosa/MG, Brazil. AFM microscope operated at intermittent contact mode. Data were obtained by scanning the samples with silicon nitride cantilever (NanoWorld™, Neuchâtel, Switzerland) with a spring constant 12 N/m in air and speed of 1 to 3 Hz.

The scanning probe image processor (NT-MDT™, Moscow, Russia) Software was used for the roughness analysis.

2.7 Atomic Force Microscopy images

The coupons with adhered cells were observed on a NT-MDT Ntegra Prima atomic force microscope (NT-MDT™, Moscow, Russia) operating at intermittent contact mode. Data were obtained by scanning the samples with silicon nitride cantilever (NanoWorld™, Neuchâtel, Switzerland) with a spring constant 12 N/m in air and speed of 1 to 3 Hz. The scanning probe image processor (NT-MDT™, Moscow, Russia) Software was used to observe the topography of the stainless steel with the adhered bacteria.

2.8 Statistical analyses

For statistical evaluation of the data obtained in adhesion tests (CFU/mL and CFU/cm² to cells in suspension and adhered cells, respectively), values were converted to log₁₀ colony-forming units. In all cases duplicate samples were used and the experiment repeated at least three times.

To analyze the data obtained in adhesion tests and the values of contact angles, free energy and adhesion energy, analyses of variance were performed using the GLM (general linear model), with the SPSS software version 18.0. The Turkey's Test was used to compare the averages and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of this study showed that *S. Enteritidis* SE86 was able to adhere to both stainless steel surfaces with numbers of cells of approximately $2.55 \log_{10}$ CFU/cm² (at time 0). These results are in agreement with findings of Bae *et al.* (2012) and Chia *et al.* (2009), who had demonstrated the same adhesion rate of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* to stainless steel AISI 304.

Lower numbers of adhered cells were observed for *L. monocytogenes* (J11) at time 0 ($1.68 \log_{10}$ CFU/cm²). Similar results were found by Stepanovic *et al.* (2004), evaluating biofilm formation by *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. on plastic surfaces. The number of attached *L. monocytogenes* (J11) ranged between $1.68 \log_{10}$ CFU/cm² in the initial time and $3.6 \log_{10}$ CFU/cm², after 8 hours of contact time. Same levels of adherence of *L. monocytogenes* to glass surfaces were observed by Chae and Schraft (2000).

Results of the present study revealed that *S. Enteritidis* (SE86) at time 0 adhered significantly more than *L. monocytogenes* (J11) on both stainless steels, and the number of adhered cells increased significantly until 8 hours of contact (Figure 1). However, after 8 hour of contact, both microorganisms reached similar counts.

The higher adhesion levels showed by *Salmonella* spp. than that by *L. monocytogenes* (at time 0) could be explained by the superiority of Gram-negative bacteria to form biofilm on inert surfaces (Pompermayer and Gaylarde, 2000; Sommer *et al.*, 1999).

Figure 2 and Figure 3 illustrated the adhesion of *S. Enteritidis* (SE86) and *L. monocytogenes* (J11) on AISI 304 and AISI 316 stainless steels surfaces. According

to these figures it is possible to observe that cells are randomly attached on the surfaces, i.e. they are not always in the grooves of stainless steel surfaces. This observation corroborates with the results obtained by other authors, which showed no correlation between surface roughness and microbial adhesion (Chia *et al.*, 2009; Tide *et al.*, 1999; Flint 1996). Nevertheless other authors have reported that adhesion is favored when the roughness has values similar to the cell size (0.9-1.0 μm), which can cause a cell entrapment in the surfaces grooves (Flint *et al.*, 2000; Shlisselberg & Yaron, 2013).

The results presented in Figure 4 showed the topography of stainless steels and their respective roughness (Ra), demonstrating that stainless steel 304 has a Ra= 0.032 μm and 316 Ra= 0.021 μm , which are not significantly different ($P < 0.05$). These values are lower than the recommended 1.0 μm maximum Ra value defined by the New Zealand's Code of Practice for Dairy Food Manufacturing (New Zealand Dairy Industry Manual, 1995) and the 0.8 μm Ra maximum values defined by the Dairy German Standard (DIN 11480, 1978). Further, the roughnesses are also lower than the cells sizes. Other authors found higher roughness values for stainless steels 316 and 304 (Julien *et al.*, 2002; Chia *et al.*, 2009), which may be due to different types of polishing used.

Results showed in this work demonstrated that there were no significant differences in adhesion levels between both bacteria and the two types of stainless. However, Flint *et al.* (2000) observed larger number of adhered *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus waiu* on AISI 316 stainless steel than on AISI 304. These authors attributed the difference to the chemical composition of stainless steels, mainly to the presence of molybdenum.

The hydrophobicity (ΔG_{IWI}) of the investigated surfaces was determined based on the contact angle measurements (Table 1). Surfaces are considered hydrophobic when $\Delta G_{\text{IWI}} < 0$, and hydrophilic when $\Delta G_{\text{IWI}} > 0$ (van Oss, 1995). Further, when the water contact angle is $< 50^\circ$ the surface is considered hydrophilic, whereas the surface is considered hydrophobic when the angle is $> 50^\circ$ (van Oss and Giese, 1995). According to the data presented in Table 1, both bacteria had a water contact angle $< 50^\circ$ and a positive ΔG_{IWI} value and thus presented hydrophilic characteristics. Values obtained for bacteria were significantly different from the stainless steels surfaces ($P < 0.05$), which were classified as hydrophobic surfaces. Therefore, according to our results, both bacteria were hydrophilic and stainless steels were hydrophobic. Despite of the different levels of hydrophobicity/hydrophilicity, there was no correlation between adhesion and the surface hydrophobicity. This is in agreement with the results of Silva *et al.* (2008) and Mafu *et al.* (1990), which carried out the adhesion under static conditions, and also with Szlavik *et al.* (2012), which was accomplished under liquid flow conditions.

Aiming to predict the ability of the microorganisms to adhere on surfaces, the free energy of interaction between the bacteria and the stainless steel, when immersed in water, was calculated (Table 2). For both bacteria, adhesion was thermodynamically favorable to both stainless steels surfaces studied, since the total free energy of adhesion was negative ($\Delta G_{1w2}^{\text{TOT}} < 0$).

The total free energy of adhesion between the bacteria and the surfaces when immersed in water, was more negative for the stainless steel AISI 316 ($P < 0.05$), which also showed higher contact angle and free energy more negative than AISI 304 ($P < 0.05$). Teixeira *et al.* (2005) evaluating the adhesion of *Pseudomonas*

aeruginosa, *Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus sciuri* and *Enterococcus faecalis* on surfaces of stainless steel 316, stainless steel 304, glass and polymethylmethacrylate also observed negative energies on stainless steel 316 surfaces. However, our results of quantification of adhered microorganisms showed no significant difference between the two types of stainless steels. These results mean that although the thermodynamics aspects are fundamental for the initial adhesion, other factors are related to microbial adhesion and also it is possible that the difference between the numbers of adhered cells is so small that it was not possible to detect with the method used in this study.

On the other hand, *S. Enteritidis* (SE 86) showed total free energy of adhesion more negative ($P < 0.05$) than *L. monocytogenes* in both stainless steels, showing that adhesion of these bacteria is thermodynamically more favorable for both stainless steels tested, which was also confirmed by our results obtained in quantification test (Figure 1). However, Sinde & Carballo (2000) showed that *Listeria monocytogenes* adhered to stainless steel 304 at higher numbers than *Salmonella* spp., although they not observed difference between the total energies of adhesion of the two bacteria.

Results of present study demonstrated that both bacteria were able to adhere to the surfaces of stainless steels AISI 304 and AISI 316, being that, initially, *S. Enteritidis* (SE 86) adhered more than *L. monocytogenes*. However, after of 8 hours of contact similar numbers of attached cells were observed for both microorganisms. The greater number of attached cells at the initial time seems more important, since the time period between cleanings normally used in food companies usually does not reach 8 hours. Thus, *S. Enteritidis* could form biofilm more easily than *L.*

monocytogenes, and contaminate foods. Further *S. Enteritidis* also revealed more negative total energy of adhesion than *L. monocytogenes*. It means that the adhesion of this bacterium was thermodynamically more favorable than the adhesion of *L. monocytogenes* to both stainless steels. This may contribute to *S. enteritidis* remains an important food pathogen. A similar patterns was observed for both stainless steels with respect to the number of adhered cells, however the stainless steel AISI 316 had more negative total energy of adhesion for both bacteria. Moreover the surfaces roughness and hydrophobicity of cells and materials did not demonstrate a positive correlation with the bacterial adherence, indicating that, although the thermodynamics aspects are fundamental for the initial adhesion, other factors are related to microbial adhesion.

4. ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) of Brazil and the Ralf Winter Company for kindly providing the stainless steel samples.

REFERENCES

- Bae, Y.; Baek, S; Lee, S. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 465–473.
- Bong Jae, P.; Travis, H.; Nehal, I. A. (2009). A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: An atomic force microscopy study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 237-243.
- Busscher, H. J. et al. (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. *Applied Environmental Microbiology*, 48 (5), 980-983.

Chae, M.S.; Schraft, H. (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology* 62, 103–111.

Chia, T.W.R.; Goulter, R.M.; Mcmeekin, T.; Dykes, G.A.; Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26, 853–859.

DIN 11480 (1978). Milk processing machinery in dairy processing plants surfaces. Germany, Koln: Beuth Verlag.

Dunne, W.M. (2002) Bacterial Adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (2), 155-166.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 8(1), p.1496.

EUROPEAN HYGIENIC ENGINEERING & DESIGN GROUP – EHEDG (2007). Materials of construction for equipment in contact with food. *Trends in Food Science & Technology*, 18, S40-S50.

Flint, S.H. (1996). Report on an evaluation of seven plasma weld samples. In: W. Scholz, *Stainless steel weld surface finish and biofilm development. Around robin test*, New Zealand Welding Center Report R8-14, (Section 5, pp. 1-7). Manukau City, New Zealand.

Flint, S.H.; Brooks, J.D.; Bremer, P.J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering* 43 (4), 235-242

Gandhi, M.; Chikindas, M. L. (2007) *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1-15, 2007.

Holah, J.T.; Thorpe, R.H. (1990). Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology* 69 (4), 599 - 608.

Hood, S. K.; Zottola, E. A. A. (1997) Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37 (2/3), 145-153.

Jullien, C.; Benezek, T; Carpentier, B.; Leuret, V.; Faille, C. (2002) Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering* 56, 77–87.

- Kusumaningrum, H. D.; Riboldi, G.; Hazeleger, W.C.; Beumer, R.R. (2003) Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 83 (3), 227-236.
- Mafu, A. A.; Roy, D.; Goulet, J.; Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection* 53, 742–746.
- Malheiros, P. da S.; Passos, C.T.; Casarin, L.S.; Serraglio, L.; Tondo, E.C. (2010). Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces on stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*, 21, 298-301.
- MARTINS, C.M.B.; MOREIRA, J.L.; MARTINS, J.I. (2014). Corrosion in water supply pipe stainless steel 304 and a supply line of helium in stainless steel 316. *Engineering Failure Analysis* 39, 65–71.
- Milles, A. A.; Misra, S. S. (1938). Estimation of the bactericide power of the bloods. *Journal of Hygiene* 38, 732-749.
- Morita, Y.; Komoda, E.; Ono, K.; Kumagai, S. (2011). Survival of biofilm-forming *Salmonella* on stainless steel bolt threads under dry conditions. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 52 (5), 299 - 303.
- New Zealand Dairy Industry Manual (1995). NZCP6: Design and layout of manufacturing premises. Section 8: General Requirements for Equipment (page 8.5, Subsection 8.3.2 Surface Finish). New Zealand Dairy Board, New Zealand.
- Pan, Y.; Breidt, F.; Gorski, L. (2010) Synergistic effect of sodium chloride, glucose and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1433–1441.
- Pompermayer, D.M.C. and Gaylarde, C.C. (2000) The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*, 17, 361–365.
- Rossoni, E.M.M.; Gaylarde, C.C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 61, 81-85.
- Sasahara K.C., Zottola E.A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, 56, 1022–1028.
- Schlisselberg, D. B.; Yaron, S. (2013) The effects of stainless steelfinish on *Salmonella Typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology* 35, 65-72.

Shi, X. and ZHU, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Food Science and Technology* 20, 407-413.

Silva, S.; Teixeira, P.; Oliveira, R.; Azeredo, J. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection* 71, 1379–1385.

Sinde, E. and Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* sp. And *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology* 17 (4), 439-447.

Sommer, P.; Martin-Rouas, C.; Mettler, E. (1999). Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiology*, 16, 503–515.

Stepanovic, S.; Cirkovic, I.; Ranin, L.; Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology* 38, 428–432.

Subramani, A.; Hoek, E.M.V. (2008). Direct observation of initial microbial deposition onto reverse osmosis and nanofiltration membranes, *Journal of Membrane Science* 319, 111–125.

Szlavik, J.; Paiva, D.S.; Mørk, N.; van den Berg, F.; Verran, J.; Whitehead, K.; Knøchel, S.; Niels, D.S. (2012). Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. *International Journal of Food Microbiology* 152, 181-188.

Teixeira, P.; Lopes, Z.; Azeredo, J.; Oliveira, R.; Vieira, M.J. (2005) Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology* 22, 247–251.

Tide, C.; Harkin, S.R.; Geesey, G. G.; Bremer, F. J.; Scholz, W. (1999). The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. *Journal of Food Engineering* 42, 85 -96.

Tondo, E.C.; Machado, T. R. M.; Malheiros, P. S.; Padrão, D. K.; de Carvalho, A. L.; Brandelli, A. (2010). Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (4), 1027-1037.

van Oss, C.J. (1995). Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5, 91–11.

van Oss, C.J. (2003) Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and a specific interactions, *Journal of Molecular Recognition* 16, 177–190.

van Oss, C.J.; Giese, R.F.; Costanzo, P.M. (1990). DLVO and non-DLVO interactions in hectorite. *Clays and Clay Minerals*, 38, 151–159.

van Oss, C.J.; Giese, R.F. (1995). The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays and Clay Minerals*, 43, 4747-477.

van Oss, C.; Chaudhury, M; Good, R. (1988) Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems, *Chemical Reviews* 88 927–941.

Wilks, S. A.; Michels, H. T.; & Keevil, C. W. (2006) Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 93-98.

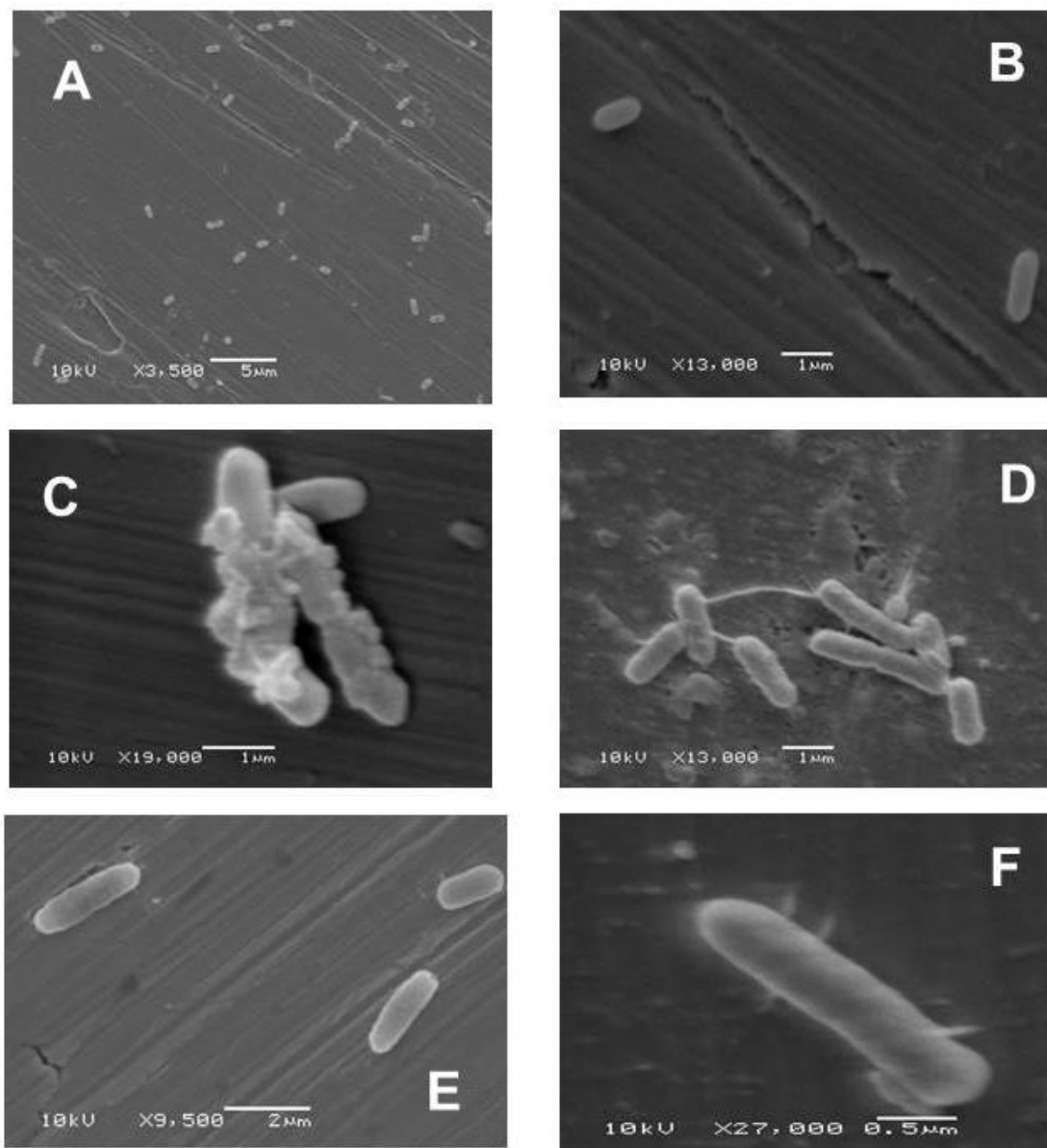


Figure 1: Representative scanning electron micrographs, showing the adherence of *L. monocytogenes*: on AISI 304 after 8 h of contact (A), on AISI 304 after 1 h (B) and *S. Enteritidis* (SE 86): on AISI 304 after 1 h (C), on AISI 316 after 8h (D, E) and on AISI 316 after 1h (F).

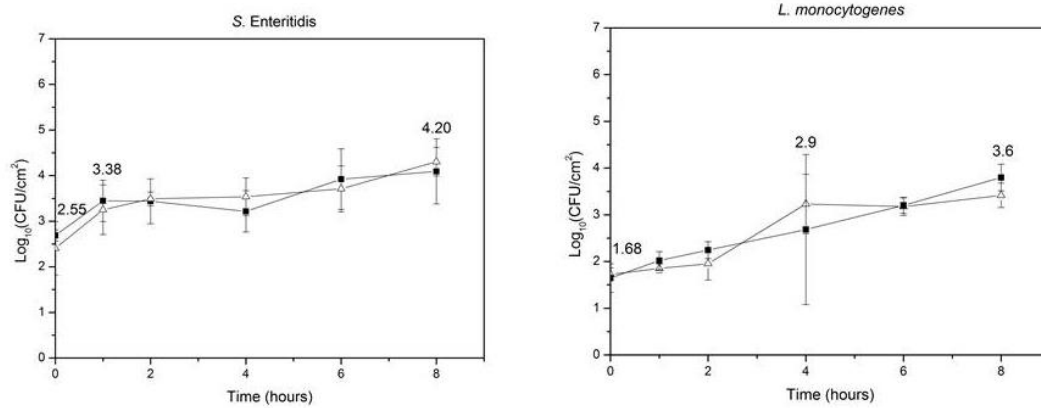
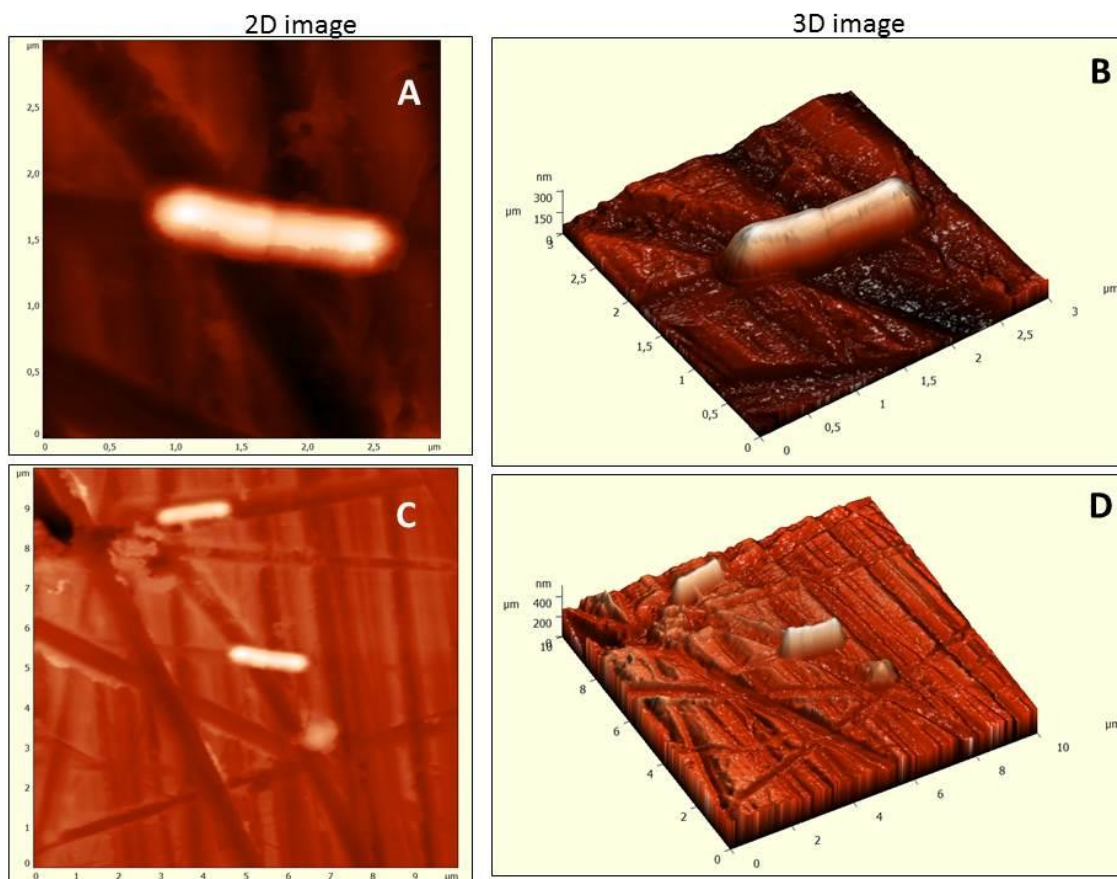


Figure 2: Salmonella Enteritidis (SE86) and Listeria monocytogenes (J11) adhesion to stainless steel AISI 304 (■) and AISI 316 (Δ) after 0, 1, 2, 4, 6 and 8 h of contact.



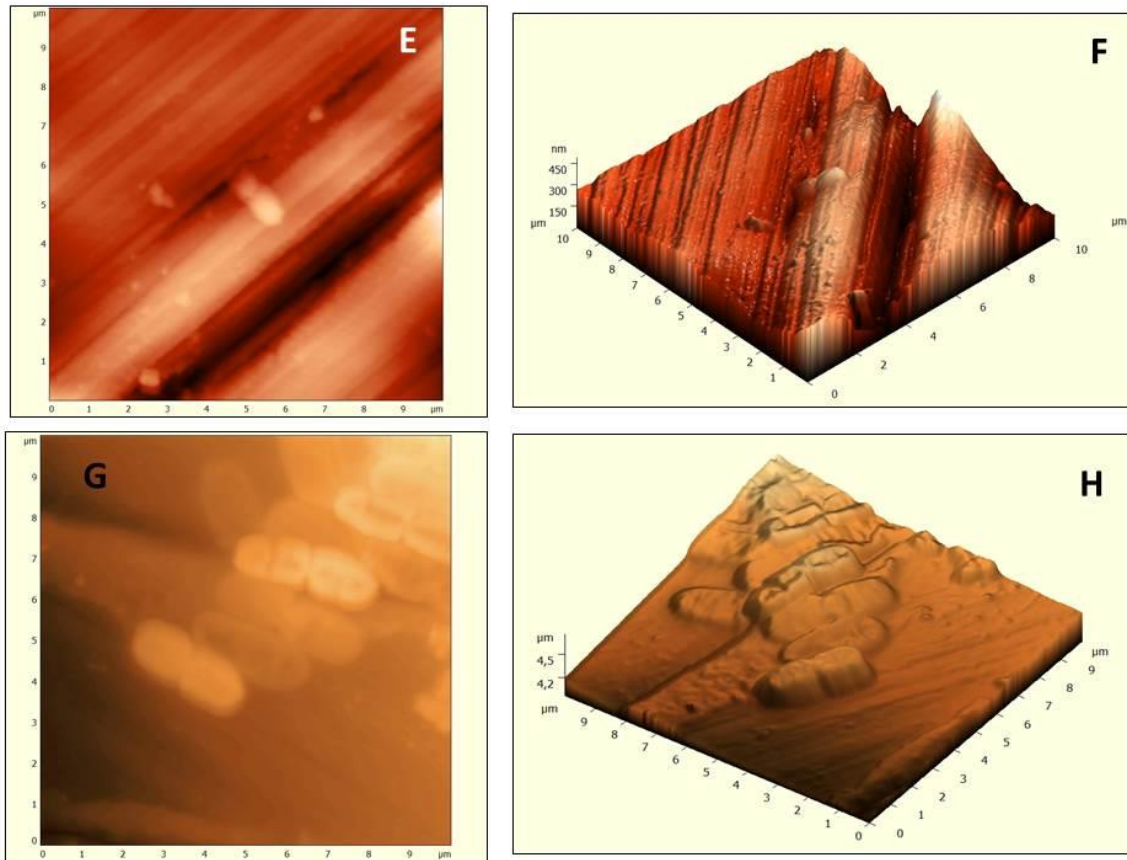


Figure 3: AFM images of *L. monocytogenes* (J11) adhered on stainless steels AISI 304 (A,B) and 316 (C,D), and *S. Enteritidis* (SE 86) adhered on stainless steels AISI 304 (E,F) and AISI 316 (G,H).

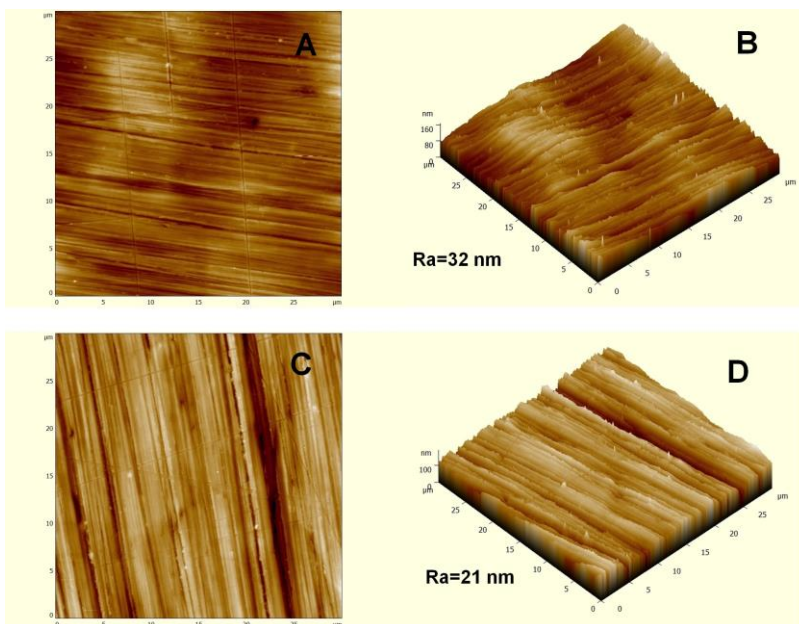


Figure 4: AFM images (2D and 3D) of stainless steels AISI 304 (A, B) and AISI 316 (C, D) and their respective roughness (Ra).

Table 1: Water contact angle (in degrees) of the cells and surfaces with their respective hydrophobicity parameters (ΔG_{Iwi}).

Surface	Water contact angle	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-	ΔG_{Iwi} (MJ. m ⁻²)
<i>L. monocytogenes</i>	27.8±2	42.12±1.6	0.44±0.2	47.80±3.6	26.04±3.2
S. Enteritidis	23.4±3	41.97±2.0	0.71±0.1	48.78±3.8	25.98±3.1
AISI 304	51.7±7	39.78±1.5	0.62±0.1	25.61±2.5	-5.18±2.4
AISI 316	54.7±3	39.69±0.9	0.83±0.3	21.44±1.5	-12.25±2.1

Table 2: Free energy of adhesion ($\Delta G_{\text{Iw2}}^{\text{TOT}}$) between the bacteria and stainless steels (AISI 304 and AISI 316) surfaces.

Bacteria	$\Delta G_{\text{Iw2}}^{\text{TOT}}$	
	AISI 304 stainless steel	AISI 316 stainless steel
<i>L. monocytogenes</i>	- 65,23	- 65,83
S. Enteritidis	- 66,03	- 69,28

3.3 ARTIGO 3

Effect of plasma nitriding surface modification of stainless steels AISI 316 and 304 on the adhesion of food pathogens

Letícia Sopena Casarin^{a*}, César Aguzzoli^b, Gabriel Vieira Soares^c, Fabrício de Oliveira Casarin^d, Adriano Brandelli^a, Eduardo Cesar Tondo^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - ICTA/UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500 /43212, 91501-970 - Porto Alegre/RS, Brasil.

^bCentro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul – UCS. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - CEP 95070-560 - Caxias do Sul/RS, Brazil.

^cDepartamento de Física, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitário, CEP: 36570-900, Viçosa/MG, Brazil.

^dPrograma de Pós Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 - Porto Alegre/RS, Brasil.

* Corresponding author: Av. Bento Gonçalves, 9500 /43212, 91501-970 - Porto Alegre, Brasil. Tel: + 5551 3308 6677; fax: +5551 3308 7048

E-mail: lscasarin@gmail.com

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that food pathogens like *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* have the ability to attach to surfaces commonly found in the food processing environment increasing the risk of foodborne diseases. Attachment of cells to food processing surfaces may be the first step in the formation of biofilms. The development of new strategies to reduce the bacterial contamination of these surfaces and then ensuring their hygienic status remains a fundamental challenge. Among the possible strategies, the plasma nitriding treatment has been used for surface modification of biomedical materials in last years. Many materials, including organic material, inorganic material, and metals could be readily surface-modified by plasma. The objective of this study is to evaluate the effect of plasma nitriding surface modification of stainless steels AISI 316 and AISI 304 on the adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. Results showed that plasma nitriding treatment be made hydrophilic the surface of the stainless steels and was able to decrease the number of attached cells compared to untreated stainless steels. The reduction ranged was from 20 % to 37.5 % for *L. monocytogenes* and from 31.7 % to 65.8 % for *S. Enteritidis*. Thus, plasma treatment is a promising technique for surface modification for the reduction of adherence of *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*, on metal surfaces that come in contact with food.

1. INTRODUCTION

Foodborne illness is a serious health problem worldwide (Schlisselberg & Yaron, 2013). The surfaces of equipment used for storage or processing are recognized as a major source of microbial contamination (Wong, 1998). Several studies have

demonstrated that food pathogens like *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* have the ability to attach to surfaces commonly found in the food processing environment, such as polyethylene, glass, rubber, and stainless steel (Bong Jae, Travis & Nehal, 2009; Chia *et al.*, 2009; Malheiros *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2011; Tondo *et al.*, 2010), increasing the risk of foodborne diseases. Actually, the inadequate cleaning and disinfection of food equipment have been identified as one of the major cause of foodborne illnesses. The stainless steels AISI (American Iron and Steel Institute) 304 and AISI 316 are the most used materials in the manufacture of various types of equipment for the food industry.

Attachment of cells to processing surfaces may be the first step in the formation of biofilms (Lewis, 2001; Steenackers *et al.*, 2012). Biofilms, in the food industry create a persistent source of microorganisms, leading to serious hygienic and safety problems and also to economic losses due to food spoilage and reduction of shelf-life (Shi & Zhu, 2009). Thus, the development of new strategies to reduce the bacterial contamination of these surfaces and then ensuring their hygienic status remains a fundamental scientific, technological and industrial challenge (Poncin-Epaillard *et al.*, 2013). Since adhesion depends on the surface properties of the materials, such as hydrophobicity, consequently, it may be presumed that the modification of these surfaces based on these characteristic, will affect their ability to the bacterial attachment. Among the possible strategies, the plasma nitriding treatment has been used for surface modification of biomedical materials in last years (Liang, 2003). These properties are mainly wettability, permeability, conductivity, hardness, corrosion resistance and also, in the last years the microbial adhesion (Fewell *et al.*, 2000, Tang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Many materials, including organic

material, inorganic material, and metals could be readily surface-modified by plasma (Øiseth *et al.*, 2002; Boudou *et al.*, 2003).

In the last decades, the study on plasma treatment applications has been gradually increased due to its low cost, relatively environmental friendliness, applicability to diverse materials of complex shapes, changing only surface properties and preserving favorable bulk characteristics of materials (Trentin *et al.*, 2014). Generally, low-pressure plasma has wide applications in materials (Kim *et al.*, 2003) like stainless steels types 304 and 316, mainly to improve surface hardness and wear resistance without sacrificing desirable corrosion resistance (Rahman *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). The objective of this study is to evaluate the effect of plasma nitriding surface modification of stainless steels AISI 316 and 304 on the adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Stainless steels substrates

Stainless steel AISI (American Iron and Steel Institute) 304 and AISI 316 mechanically brushed polished, also known as number 4 finish, were kindly provided by Metalúrgica Ralf Winter™ (Ralf Winter, Alvorada, Brazil). Prior to plasma treatment and bacterial adhesion assays, stainless steel coupons were prepared (dimensions 2cm x 2cm and 0.2cm) and cleaned using a commercial detergent (Unilever, Brazil), followed by immersion in ethylic alcohol (70% v/v) in order to remove grease. Then, the coupons were autoclaved at 121°C for 15 min and dried at 60°C for 2 h (adapted from Rossoni & Gaylarde, 2000). The coupons were kept inside sterile Petri dishes, at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), until the time of testing.

2.2. Plasma surface modification

Stainless steels coupons were inserted in a vacuum chamber that was pumped down to a pressure of 5 Pa. The chamber was pressurized with the feeding gases using mass flow controllers, where a Pirani gauge was used to monitor the pressure. Pumping was maintained and the pressure was kept by flowing gas continuously into the chamber. Initially the substrates were treated with DC (direct current) power supply with mean voltage 585 V and current 0.2 A for surface etching for 30 min. After the etching process was used a radio frequency power source (13.56 MHz) to generate the plasma at 100 W for 90 min. The total gas pressure was kept at 30 Pa and the gas mixture was fixed at 9% H₂ and 91% N₂ (purity 99.999%) during process. After the treatment, samples were removed from the vacuum chamber and immediately sealed in a sterile package that was not opened until surface characterization or bacterial adhesion assays.

2.3. Bacterial Strains

Two bacterial strains isolated by the Laboratory of Microbiology and Food Control of Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil) were used in this study. The first microorganism was a Gram-negative food pathogen named *S. Enteritidis* (SE86) isolated from a cabbage responsible for a foodborne outbreak occurred in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil. This microorganism has the same genotypic and phenotypic characteristics of the majority of the identified *S. Enteritidis* responsible for Salmonellosis occurred in the State of RS, in the last decade (Tondo & Ritter, 2012). The second microorganism was a

Gram-positive food pathogen identified as *L. monocytogenes* (J11) isolated from a bovine slaughterhouse of the State of RS, Brazil.

Before each experiment, *S. Enteritidis* SE86 was cultivated in Brain Infusion Broth - BHI (OXOID, Basingstoke, England) at 37° C for approximately 18 h and the *L. monocytogenes* was grown in BHI supplemented with 0.6% yeast extract (OXOID, Basingstoke, England), incubated at 37°C for approximately 30 h. After incubation, both microorganisms were diluted in 0.1% peptone water (OXOID, Basingstoke, England) until final concentrations of 10⁵ CFU/ml.

2.4. Contamination of coupons and evaluation of bacterial adhesion

Artificial contamination was carried out immersing stainless steels coupons (plasma treated and untreated) in 100 ml of BHI broth (Oxoid, Basingstoke, UK) containing 10⁵ CFU/ml. The coupons were kept inside bacterial suspension, at room temperature (25 ± 1°C), for 1 hour (adapted from Kusumaningrum *et al.*, 2003) in order to promote bacterial adhesion. After that, coupons were rinsed with 1 ml of sterile distilled water to remove the weakly adhered cells. The coupons were subsequently immersed in 25 ml of 0.1 % peptone water (Oxoid) and immediately treated with an ultrasonic bath - sonicator (Unique Group, Indaiatuba, Brazil), in order to totally remove adhered cells (Sinde & Carballo, 2000). Two decimal dilutions of the bacterial suspension of each coupon were prepared (10⁻¹ and 10⁻²). Then 20 µl of each dilution were plated on Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid) and on TSA added with 0.6 % of yeast extract (Oxoid). TSA plates were used to count *S. Enteritidis*, while TSA containing 0.6% yeast extract were used to enumerate *L. monocytogenes*. Enumerations were carried out using the drop method (Milles & Misra, 1938). TSA plates were incubated at 37° C for 18 h and 30 h for *S. Enteritidis* and *L.*

monocytogenes, respectively. The antibacterial rate (AR) was determined by Equation 1, as recognized for antibacterial effect (Lin *et al.*, 2011).

$$AR(\%) = \frac{100(N1 - N2)}{N1} \quad (1)$$

N1, number of bacteria adhered on untreated samples and N2, number of bacteria adhered on treated samples.

The experiments were performed in duplicate and each experiment was repeated three times.

2.5. Hydrophobicity and free energy of adhesion

Bacterial hydrophobicity was measured by the contact angle method as described by Busscher *et al.* (1984). Bacteria suspension (10^8 CFU/ml) was washed three times in phosphate buffered saline (PBS) and were filtered using 0.45mm pore diameter filters (Sartorius, Goettingen, Germany). Filters with bacteria were maintained for 1 hour in Petri dishes containing 1% (w/v) agar-agar Type I (Himedia Laboratories, Mumbai, India) supplemented with 10% (v/v) glycerol (CAQ – Casa da Química, Diadema, Brazil) to establish constant moisture content. Filters were then transferred to microscope glass slides. Five-microliters drops of two polar solvents: water and formamide (Vetec – Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Brazil) and one nonpolar solvent: α -bromonaphthalene (Vetec – Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Brazil), were deposited on bacterial layer, using a goniometer (Krus DSA30, Hamburg, Germany), according to the recommendations of van Oss (1995). Hydrophobicity of the stainless steels AISI 304 and AISI 316 (plasma treated and untreated) was estimated by the same technique, using the measurement of the

contact angle formed by the three solvents with different polarities on the surface of stainless steels. Measures of four drops on each surface or bacteria were performed and the averages of these measurements were considered as a result.

Bacteria and materials surface free energies (ΔG_{iwi}) were obtained by calculating the surface tension components of the material (cells or stainless steel), which was obtained from the contact angle of the three liquids, using the tables reported by van Oss *et al.* (1990), according to the following equations (van Oss, 1995):

$$(1 + \cos\theta)\gamma_1^{TOT} = 2\left(\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_1^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_1^+\gamma_s^-}\right) \quad (1)$$

Where, θ is the contact angle, $\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$, and γ^{LW} is the Lifshitz–van der Waals component of the surface free energy and γ^+ and γ^- are the electron acceptor and electron donor parameters, respectively.

According to the thermodynamical analysis (Teixeira *et al.*, 2005), when studying the interaction between substances 1 and 2 that are immersed or dissolved in water (w), the total interaction energy ΔG_{1w2}^{TOT} ; can be expressed as:

$$\Delta G_{1w2}^{TOT} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_{1w}^{LW} - \gamma_{2w}^{LW} + \left[\sqrt{\gamma_w^+}(\sqrt{\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_w^-}) + \sqrt{\gamma_w^-}(\sqrt{\gamma_1^+} + \sqrt{\gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_w^+}) - \sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+} \right] \quad (2)$$

In this case, 1 represents the support material (stainless steel) and 2 the bacteria. Thermodynamically, if $\Delta G_{1w2}^{TOT} < 0$ adhesion is favorable, on the contrary, adhesion is not expected to occur if $\Delta G_{1w2}^{TOT} > 0$ (Teixeira *et al.*, 2005).

2.6. Statistical analysis

For statistical evaluation of the data obtained with the adhesion tests (CFU/mL and CFU/cm² to cells in suspension and adhered cells, respectively), values were converted to log₁₀ CFU. In all cases, duplicate samples were used and the experiment repeated at least three times.

To analyze the data obtained with adhesion tests and the values of contact angles, free energy and adhesion energy, analysis of variance was performed with the SPSS software version 18.0. The Turkey's Test was used to compare the averages and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results in Figure 1 show that plasma treated stainless steels were able to decrease the number of attached cells compared to untreated stainless steels. The reduction ranged from 20 % to 37.5 % for *L. monocytogenes* and from 31.7 % to 65.8 % for *S. Enteritidis*. Similar results were found by Trentin *et al.* (2014) which observed adhesion reductions of 83 % for *Klebsiella pneumoniae*, 77 % for *Serratia marcescens*, 65 % for *Staphylococcus aureus* and 48 % for *Enterobacter cloacae* on polystyrene treated with plasma nitriding with similar conditions to those used in this work. However Lin *et al.* (2011) achieved a reduction of 98.8 % and 99.9 % of *Escherichia coli* adhered on stainless steel type 303 treated with N₂/H₂ plasma nitriding. The pressure and the power used were higher than we have used (133.3 Pa, 700 W), and the time of exposure was shorter (80 minutes). Hung *et al.* (2012) observed 99.9 % reduction of *Escherichia coli* on stainless steel type 304 and 303

treated with microwave plasma nitriding. However, Dong et al. (2011) not observed reduction in the numbers of *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis* adhered to the surface of stainless steel AISI 316 treated with plasma nitriding, using a pressure of 4 mbar at 430 °C, for 15 hours. This result can be explained by the low percentage of nitrogen used (25 %).

The lower reductions observed in the present study compared with the results of Dong et al. (2011), Lin et al. (2011) and Hung et al. (2012), may be due to the treatment conditions used by us, which were softer than those used by other authors. The main difference compared with other works is in the power density, and the gas mixture in plasma process that were low values compared with them.

The hydrophobicity values obtained (Table 1) confirmed that under the conditions used by us, was possible to achieve only a slight change in the hydrophobicity of the surfaces, in other words, treated stainless steel showed a slightly hydrophilic characteristic, which differs significantly ($P < 0.05$) of the hydrophobicity of not treated stainless steels, but still represents a very small change of the surface characteristics. Whereas the two bacteria studied showed hydrophilic character ($\Delta G_{iwi} < 0$) and is well known that the adhesion between hydrophilic surfaces is harder (Trentin *et al*, 2014), as much higher hydrophilic is the stainless steel must be lower the adherence. Results obtained by Trentin *et al.* (2014) also have shown such relationship, once they have reported a reduction in the adhesion of hydrophilic bacteria and no reductions in a hydrophobic bacterium *S. epidermidis*, when studied adherence on polyethylene treated by plasma nitriding.

Results presented in Figure 1 also showed that AR of *S. Enteritidis* was higher than AR of *L. monocytogenes*, whereas the values obtained for the hydrophobicity of

bacteria showed no significant difference ($P > 0.05$) between the hydrophobicity of both bacteria. These results may be due the influence of other characteristics of *S. Enteritidis*, such the presence of fimbriae, pili and capsule that could be involved in the adhesion process. The observed values of the number of attached cells to untreated stainless steels (data not shown) showed that *S. Enteritidis* also adhered more than *L. monocytogenes* on the untreated stainless steels. However, the AR values were higher for both bacteria on stainless steel AISI 316 plasma treated, which showed to be more hydrophilic.

Results presented in Table 2 show that the adhesion of both bacteria is thermodynamically less favorable (ΔG_{1w2}^{TOT} less negative) in treated stainless steels, compared to the untreated stainless steels. Further, the adhesion to stainless steel AISI 316 plasma treated is less favorable (ΔG_{1w2}^{TOT} less negative) than to stainless steel AISI 304 plasma treated. These results corroborate with the AR observed, which were higher, in other words adhesion was lower in stainless steel AISI 316 plasma treated. Gontijo *et al.* (2007) observed a greater solubility of nitrogen in stainless steel AISI 316 after the plasma nitriding treatment when compared with the AISI 304 and attributed this phenomenon to a molybdenum content of AISI 316, which may explain the higher hydrophilicity observed in stainless steel AISI 316.

The AR values found show that the plasma nitriding treatment is able to change the surface, reducing the bacterial adhesion. However, the reduction rates of less than 90 % (1 log), as observed in this study and others (Dong *et al.*, 2011 and Trentin, *et al.*, 2014) cannot be enough when foods present high bacterial contamination, once generally, sanitizers are able to reduce around 2-3 log of bacteria, and a pasteurization process is able to decrease approximately 5-6 log of

bacteria (Forsythe, 2010). On the other hand, good quality foods in real processing conditions generally present low pathogen loads, and a reduction of 90 % in the adhesion of than, may be enough to avoid foodborne outbreaks.

In conclusion, the plasma treatment is a promising technique for surface modification for the reduction of adherence of microorganisms, not only in medical materials, but also on metal surfaces that come in contact with food, however further studies are needed in order to meet the best treatment conditions required to obtain higher reduction rates.

4. REFERENCES

BONG JAE, P.; TRAVIS, H.; NEHAL, I. A. A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: An atomic force microscopy study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v.73, p.237–243, 2009.

BOUDOU, J.P.; PAREDES, J.I.; CUESTA, A.; MARTINEZ-ALONSO, A.; TASCÓN, J.M.D. Oxygen plasma modification of pitch-based isotropic carbon fibres. *Carbon*. v. 41, n.1, p. 41-56, 2003.

BUSSCHER, H. J. et al. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. *Applied Environmental Microbiology*. v. 48, n. 5, p. 980-983, 1984.

CHIA, T.W.R.; GOULTER, R.M.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G.A.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, v. 26, p. 853–859, 2009.

DONG, Y.; LI, X.; TIAN, L.; BELL, T.; SAMMONS, R.L.; DONG, H. Towards long-lasting antibacterial stainless steel surfaces by combining double glow plasma silvering with active screen plasma nitriding. *Acta Biomaterialia*. v.7, p.447–457, 2011.

FEWELL, M.P.; MITCHELL, D.R.G.; PRIEST, J.M.; SHORT, K.T.; COLLINS, G.A. Nitriding at low temperature. *Surfaces and Coatings Technology*. 131(1-3), 284 – 290, 2000.

FORSYTHE, S. J. *The Microbiology of Safe Food*, Second edition. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. 476p.

GONTIJO, L.C.; MACHADO, R.; CASTELETTI, L.C.; KURI, S.E.; NASCENTE, P.A.P. Comparação entre os comportamentos dos aços inoxidáveis AISI 304I e AISI 316I nitretados a plasma. Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo. v.26, n. 3, 145-150, 2007.

HUNG, C. F.; WU, C. Z.; LEE W. F.; OU, K. L.; LIU, C. M.; PENG, P. W. The Effect of Nitrided Layer on Antibacterial properties for Biomedical Stainless Steel. Physics Procedia. v. 32 , p. 914 – 919, 2012.

KIM, S.K.; YOO, J.S.; PRIEST, J.M.; FEWELL, M.P. Characteristics of martensitic stainless steel nitrided in a low-pressure RF plasma. Surface and Coatings Technology. v.163 – 164, p.380–385, 2003.

KUSUMANINGRUM, H .D; *RIBOLDI,G.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R.* Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. Journal of Food Protection. v.65, n. 1, p. 61-65, 2002.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45 (4), 999-1007, 2001.

LI, G.J.; PENG, Q.; LI, C.; WANG, Y.; GAO, J.; CHEN, S.Y.; WANG, J.; SHEN, B.L. Effect of DC plasma nitriding temperature on microstructure and dry-sliding wear properties of 316L stainless steel. Surface CoatingsTechnology. v. 202, n.12, 2749- 2754, 2008.

LIANG, W. Surface modification of AISI 304 austenitic stainless steel by plasma nitriding. Applied Surface Science, 211, (1-4) 308–314, 2003.

LIN, LI-HSIANG; CHEN, SHIH-CHUNG; WU, CHING-ZONG; HUNG, JING-MING; OU, KENG-LIANG. Microstructure and antibacterial properties of microwave plasma nitrided layers on biomedical stainless steels. Applied Surface Science. v. 257, p.7375–7380, 2011.

MALHEIROS, P. da S.; PASSOS, C.T., CASARIN, L.S.; SERRAGLIO, L.; TONDO,E.C. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. Food Control. v.21, p. 298-301, 2010.

MILLES, A. A.; MISRA, S. S. (1938). Estimation of the bactericide power of the bloods. Journal of Hygiene 38, 732-749.

MORITA, Y.; KOMODA, E.; ONO, K.; KUMAGAI, S. Survival of biofilm-forming Salmonella on stainless steel bolt threads under dry conditions. Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. v. 52, n.(5), p.299 – 303, 2011.

ØISETH, S.K.; KROZER, A.; KASEMO, B.; LAUSMAA, J. Surface modification of spin-coated high-density polyethylene films by argon and oxygen glow discharge plasma treatments. *Applied Surface Science*. v. 202, n. (1-2), p.92-103, 2002.

PONCIN-EPAILLARD, F.; HERRY, J.M.; MARMEY, P.; LEGEAY, G.; DEBARNOT, D.; BELLON-FONTAINE, M.N. Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface - a potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria? *Materials Science and Engineering C*. v.33, p.1152–1161, 2013.

RAHMAN, M.; HAIDER, J.; HASHMI, M.S.J Low temperature plasma nitriding of 316 stainless steel by a saddle field fast atom beam source *Surface Coatings Technology*. v. 200, n.5-6, p.1645-1652, 2005.

SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steelfinish on *Salmonella Typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*. v.35, p.65-72, 2013.

STEENACKERS, H., HERMANS, K., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S.C.J. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. v. 45, n.2, 502-531, 2012.

SHI, X., ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. v.20 n.9, 407-413, 2009.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. And *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*. v.17, n. 4, p.439-447, 2000.

TANG, S.; KWON, O.; LU, N.; CHOI, H. Surface characteristics of AISI 304L stainless steel after an atmospheric pressure plasma treatment. *Surface and Coatings Technology*. v.195, n.2-3, 298-306, 2005.

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

TONDO, E. C.; MACHADO, Tais Raquel Marcon; MALHEIROS, P. S.; PADRAO, D. K.; Carvalho, A. L.; BRANDELLI, A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 41, p. 10-20, 2010.

TONDO, E.C.; RITTER, A.C. *Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: A Review of the Last Decade. In: *Salmonella Classification, Genetics and Disease Outbreaks*. Nova Iorque: Nova Science Publishers Inc., 2012. p. 175-181.

TRENTIN, D.S; BONATTO, F.; ZIMMER, K.R.; RIBEIRO,V.B.; ANTUNES, A.L.S.; BARTH, A.L.; SOARES, G.V.; KRUG,C.; BAUMVOL, I.J.R.; MACEDO, A.J. N₂/H₂ plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. *Surface & Coatings Technology*, in press, 2014.

VAN OSS, C.J. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A*. v. 78, p.1-49, 1990.

VAN OSS, C.J. Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v.5, n. 91–11, 1995.

WANG, J.; XIONG, J.; PENG, Q.; FAN, H.; WANG, Y.; LI, G.; SHEN, B.. Plasma Nitriding Parameters on Microstructure and Properties of 304L Stainless Steel. *Materials Characterization*. v.60, n.3, 197-203, 2009.

WONG, A.C. Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science*. v.81, p.2765–2770, 1998.

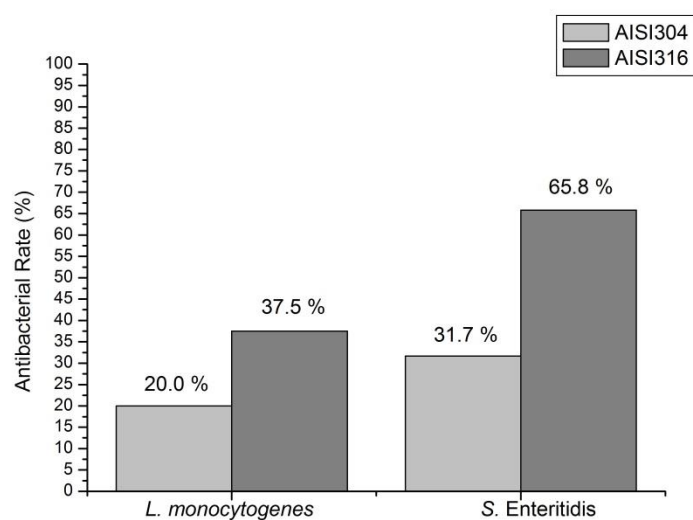


Figure 1: Antibacterial Rate (AR) of Stainless steels AISI 304 and AISI 316 plasma nitriding treated.

Table 1: Water contact angle (in degrees) of the stainless steels surfaces (plasma treated and untreated) and bacteria surfaces and, also their respective hydrophobicity parameters.

Surface	Water contact angle	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-	ΔG_{iwi} (mJ.m ⁻²)
<i>L. monocytogenes</i>	27.8±2	42.12±1.6	0.44±0.2	47.80±3.6	26.04±3.2
<i>S. Enteritidis</i>	23.4±3	41.97±2.0	0.71±0.1	48.78±3.8	25.98±3.1
Untreated AISI 304	51.7±7	39.78±1.5	0.62±0.1	25.61±2.5	-5.18±2.4
Untreated AISI 316	54.7±3	39.69±0.9	0.83±0.3	21.44±1.5	-12.25±2.1
Plasma treated AISI 304	50.3±7	38.35±1.6	0.41±0.1	29.60±2.2	2.24±0.3
Plasma treated AISI 316	49.4±5	40.82±2.0	0.02± 0.005	34.34±2.6	10.02±0.5

Table 2: Free energy of adhesion (ΔG_{1w2}^{TOT}) between the bacteria and stainless steels (AISI 304 and AISI 316) plasma treated and untreated.

Bacteria	ΔG_{1w2}^{TOT}			
	AISI 304		AISI 316	
	Untreated stainless steels	Treated stainless steels	Untreated stainless steels	Treated stainless steels
<i>L. monocytogenes</i>	- 65.23	- 60.67	- 65.83	- 57.59
<i>S. Enteritidis</i>	- 66. 03	- 60.08	- 69.28	- 57.05

4. DISCUSSÃO GERAL

A adesão bacteriana tem grande importância nas indústrias de alimentos e serviços de alimentação, uma vez que a presença de microrganismos pode propiciar a contaminação dos alimentos e, conseqüentemente a ocorrência de surtos. Muitas bactérias patogênicas já foram isoladas da superfície de equipamentos e utensílios utilizados em empresas de alimentos, sendo estas superfícies, portanto, consideradas como importantes fontes de contaminação. Adicionado a isso, entender os fatores envolvidos na adesão de dois patógenos alimentares da atualidade, sendo um Gram-positivo e um Gram-negativo, também passa a ser importante, uma vez que esses conhecimentos podem ser de interesse para indústrias de alimentos e de equipamentos e para órgãos fiscalizadores e de pesquisa.

Existem muitas pesquisas mostrando a capacidade de adesão de diversos microrganismos patogênicos a diferentes materiais, como aço inoxidável, vidro, polímeros e borracha, no entanto, são poucos os trabalhos que estudaram os fatores envolvidos nessa adesão. Da mesma forma, também são poucos os trabalhos que avaliaram a adesão microbiana em soldas, as quais são amplamente utilizadas na fabricação e reparo de equipamentos de indústrias de alimentos. Durante a elaboração do presente estudo, foram encontrados apenas dois artigos,

os quais foram publicados ainda na década de 90, sendo que nenhum deles avaliou as soldas MIG e TIG.

Os resultados deste trabalho demonstraram que *Salmonella* Enteritidis (SE 86) é capaz de aderir à superfície de aço inoxidável e às soldas (MIG e TIG), com contagens de aproximadamente $3 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$, considerando-se uma contaminação artificial inicial de 5 log. Estes resultados estão de acordo com os achados por Bae et al (2012) e Chia et al (2009), que observaram a mesma contagem para a adesão de *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* em aço inoxidável.

Listeria monocytogenes (J11) também aderiu ao aço inoxidável e às soldas, mas as taxas iniciais foram significativamente ($p < 0,05$) menores do que aquelas demonstradas por *S. Enteritidis* (SE86). Resultados semelhantes foram encontrados por Stepanovic et al (2004), quando avaliaram a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em superfícies de plástico. O número de células de *L. monocytogenes* aderidas observado no presente estudo variou entre 10^2 e 10^3 UFC.cm^{-2} . Contagens semelhante também foram observadas por Chae & Schraft (2000) quando avaliaram a adesão de *L. monocytogenes* em superfícies de vidro.

Foi possível observar também que houve diferença significativa ($p < 0,05$) na aderência bacteriana, em diferentes tempos de contato, para ambas as soldas, e que *S. Enteritidis* (SE86) demonstrou o maior número de células aderidas após 1 h de contato com as superfícies. Contudo, *L. monocytogenes* demonstrou os mesmos níveis de adesão somente após 4 h. Esta diferença pode ser explicada pela

conhecida superioridade de bactérias Gram-negativas para formar biofilmes em superfícies inertes (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000; SOMMER et al, 1999).

Ao contrário das expectativas, os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos níveis de adesão entre os dois tipos de solda (MIG e TIG) para *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11). Estes resultados foram observados apesar da aparência muito distinta entre as soldas MIG e as soldas TIG. Afinal, as soldas TIG apresentaram uma superfície com algumas partes rebaixadas, porém mantendo uma rugosidade superficial visualmente aceitável, ou seja, com poucas irregularidades. Enquanto que as soldas MIG tinham uma superfície elevada e acabamento superficial bastante pobre, o que significa que apresentavam muitas imperfeições. Além disso, as soldas polidas exibiram superfícies com perfil liso e uma rugosidade bastante inferior e as soldas sem polimento superfícies bastante irregulares e rugosidade elevada.

As soldas MIG e TIG também apresentam diferenças significativas nos valores de rugosidade ($p < 0,05$) e ambas apresentaram valores de rugosidade superficial média acima de 1,0; valor máximo de Ra (Rugosidade absoluta), definida pelo New Zealand's Code of Practice for Dairy Food Manufacturing (NEW ZEALAND DAIRY INDUSTRY MANUAL, 1995) e 0,8 valor máximo de Ra definido pelo Dairy German Standard (DIN 11480, 1978).

Os resultados obtidos mostraram que não existiu correlação entre a adesão de bactérias e os valores de Ra, uma vez que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na adesão nos diferentes tipos de soldas e entre as soldas polidas e não polidas. Flint (1996) também não encontraram correlação entre a

rugosidade da superfície, a presença ou ausência de soldas, e a adesão de *Streptococcus* (resistentes ao calor e responsáveis por problemas de deterioração em laticínios). A falta de correlação entre a rugosidade da superfície e a adesão de *L. monocytogenes* em diferentes superfícies de soldas também foi descrita por Tide et al (1999).

Em um dos poucos estudos sobre a colonização bacteriana em soldas, Walsh et al (1993) apresentaram evidências de que a adesão bacteriana inicial foi aleatória em toda superfície, mas que as colônias de células se formaram com mais frequência e se desenvolveram mais rapidamente nas zonas soldadas do que nas demais partes lisas (sem solda). Com base nesta observação, as soldas têm sido propostas como locais de adesão preferencial e aprisionamento de microrganismos (NOTERMANS et al, 1991). No entanto, de acordo com os resultados não se observou diferenças significativas ($p > 0,05$) nos níveis de adesão de *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11) entre as superfícies soldadas (MIG e TIG) e superfícies não soldadas (aço inoxidável sem soldas). Resultados semelhantes foram observados por Tide et al (1999), ao avaliar a adesão de *L. monocytogenes* a superfícies soldadas e não soldadas, quando não observaram diferenças significativas entre a densidade de células bacterianas associadas com a superfície soldada e a superfície do metal não soldado adjacente. Estes mesmos pesquisadores (TIDE et al, 1999) também demonstraram que *L. monocytogenes* e bactérias de um consórcio (composto por três espécies isoladas de soldas de equipamentos de uma planta de processamento de frutos do mar), colonizaram a superfície sem polimento de diferentes soldas e do metal (aço inoxidável sem solda), mesmo quando estas soldas tinham fendas e ranhuras. Comportamento semelhante

foi demonstrado no presente trabalho, através das imagens de microscopia eletrônica de varredura, em que se observou que as bactérias aderiram de forma semelhante em todas as áreas dos corpos de prova.

Pesquisas têm demonstrado que a hidrofobicidade das superfícies sólidas estão envolvidas na adesão bacteriana. Neste estudo a hidrofobicidade (ΔG_{iwi}) das superfícies foi determinada com base na medida do ângulo de contato e calculada utilizando as equações propostas por van Oss (1991) e as tabelas das componentes da tensão superficial dos líquidos (VAN OSS & GIESE, 1995). Sendo que as superfícies são consideradas hidrofóbicas quando possuem $\Delta G_{iwi} < 0$, e hidrofílicas quando $\Delta G_{iwi} > 0$ (van Oss, 1995). Além disso, quando o ângulo de contato (θ) com a água é menor que 50° a superfície é considerada hidrofílica, enquanto que a superfície é considerada hidrofóbica quando o ângulo é maior que 50° (VAN OSS & GIESE, 1995). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, apenas as bactérias apresentaram ângulo de contato com água inferior a 50° ($\theta < 50^\circ$) e um valor positivo de ΔG_{iwi} e demonstraram, portanto, característica hidrofílica. Os valores obtidos de ΔG_{iwi} para as bactérias foram significativamente diferentes daqueles observados para as superfícies das soldas ($p < 0,05$), as quais foram todas hidrofóbicas ($\theta > 50^\circ$). Apesar dos diferentes níveis de hidrofobicidade/hidrofilicidade, não foi observada correlação entre a adesão e a hidrofobicidade. Esta observação está de acordo com os resultados de Slavick et al (2012), Silva et al (2008) e Mafu et al (1990).

Neste estudo também foi avaliada a adesão dos dois patógenos alimentares nas superfícies dos dois aços mais utilizados na indústria de alimentos, o AISI 304 e o AISI 316. A adesão foi avaliada em seis tempos diferentes, com o

objetivo de avaliar o efeito do tempo na adesão. O tempo máximo (8 horas) foi escolhido considerando o tempo que normalmente um equipamento pode ficar sem higienização em uma indústria de alimentos, que normalmente não ultrapassa o tempo de um turno de trabalho (8 horas). Os resultados deste estudo mostraram que *S. Enteritidis* (SE86) foi capaz de aderir às superfícies dos dois aços inoxidáveis (AISI 304 e AISI 316) com um número de células de aproximadamente $2,55 \log \text{CFU.cm}^{-2}$ (no tempo 0). Estes resultados estão de acordo com os observados por Bae et al (2012) e Chia et al (2009), que observaram a mesma contagem na adesão de *Salmonella* Typhimurium e *L. monocytogenes* em aço inoxidável AISI 304.

Foi observado também que o número de células de *L. monocytogenes* (J11) aderidas no tempo 0 ($1,68 \log \text{UFC.cm}^{-2}$) foi menor do que o número de *S. Enteritidis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Stepanovic et al (2004), quando avaliaram a formação de biofilme por *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em superfícies de plástico. Os resultados do presente estudo mostraram que o número de *L. monocytogenes* aderidas variou entre $1,68 \log \text{UFC.cm}^{-2}$ no tempo inicial e $3,6 \log \text{UFC.cm}^{-2}$, após 8 horas de contato. Os mesmos níveis de adesão de *L. monocytogenes* em superfícies de vidro foram observados por Chae & Schraft (2000).

Os resultados revelaram ainda que *S. Enteritidis* (SE86) no tempo 0 aderiu significativamente mais do que *L. monocytogenes* (J11) em ambos os aços inoxidáveis, assim como foi observado nas soldas (MIG e TIG). O número de células aderidas aumentou significativamente ($p < 0,05$), até 8 horas de contato e depois deste período, ambos os microrganismos atingiram contagens similares ($3,6 \log$

UFC.cm⁻² e 4,2 log UFC.cm⁻², para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, respectivamente).

De acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia de força atômica, foi possível observar que as células estavam aderidas ao acaso sobre as superfícies, isto é, elas nem sempre estavam nas ranhuras das superfícies do aço inoxidável. Esta observação corrobora com os resultados obtidos nos experimentos realizados com as soldas (MIG e TIG) e por trabalhos de outros pesquisadores, que mostraram nenhuma correlação entre a rugosidade da superfície e a adesão microbiana (FLINT 1996; TIDE et al, 1999; CHIA et al, 2009).

Alguns pesquisadores, no entanto, relataram que a adesão é favorecida quando a rugosidade da superfície tem valores semelhantes ao tamanho das células (0,9-1,0 µm), o que poderia causar um aprisionamento das células nas ranhuras das superfícies, devido a maior área de contato (FLINT et al, 2000; SHLISSELBERG & YARON, 2013). Não se verificou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de rugosidade (Ra) para o aço inoxidável AISI 304 (Ra = 0.032 µm) e AISI 316 (Ra = 0.021µm). Vale ressaltar ainda que estes valores observados foram inferiores a 1,0 e 0,8 µm, valores máximos de Ra definidos por órgãos internacionais (NEW ZEALAND DAIRY INDUSTRY MANUAL, 1995; DIN 11480, 1978). Além disso, os valores de rugosidade foram inferiores ao tamanho das células, o que possivelmente possibilitou menor adesão devido a menor superfície de contato entre a bactéria e as ranhuras. Outros autores encontraram valores de rugosidade mais elevados do que os observados neste estudo, para os aços inoxidáveis AISI 316 e 304 (JULIEN et al, 2002; CHIA et al, 2009), o que pode ser devido às diferenças nos tipos e graus de polimento utilizados.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram também que não houve diferenças significativas nos níveis de adesão entre ambas as bactérias nos dois tipos de aço inoxidável ($p > 0,05$). No entanto, Flint et al (2000) observaram um maior número de *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus waiu* aderidos em aço inoxidável AISI 316 do que em AISI 304. Estes autores atribuíram esta diferença à composição química dos aços inoxidáveis, principalmente, à presença de molibdênio.

Neste estudo os aços foram classificados como superfícies hidrofóbicas ($\Delta G_{iwi} < 0$), assim como as soldas (MIG e TIG), enquanto que ambas as bactérias foram hidrofílicas. Também não foi observada correlação entre a adesão e a hidrofobicidade das superfícies.

Além das teorias DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek) e XDLVO (DLVO Extendida) (VAN OSS, 2003; VAN OSS, CHAUDHURY & GOOD, 1988), as quais levam em consideração a energia livre das superfícies e das bactérias separadamente (ΔG_{iwi}), Teixeira et al (2005) utilizaram a energia livre de interação entre os microrganismos e as superfícies juntas para avaliar a capacidade destes microrganismos de aderirem às superfícies, para tanto foi utilizada a Teoria Termodinâmica. Segundo esta Teoria, se ΔG_{1w2}^{TOT} (energia de interação entre a superfície 1 – aço inoxidável e a superfície 2 – bactéria, em meio líquido - w) for menor que 0 ($\Delta G_{1w2}^{TOT} < 0$) a adesão é favorável, pelo contrário, não se espera que ocorra a adesão se ΔG_{1w2}^{TOT} for maior que 0 ($\Delta G_{1w2}^{TOT} > 0$) (TEIXEIRA et al, 2005). Os resultados deste trabalho mostram que para ambas as bactérias, a adesão foi termodinamicamente favorável nos dois aços inoxidáveis estudados, visto que a energia livre total de adesão foi negativa ($\Delta G_{1w2}^{TOT} < 0$).

A energia livre total de adesão entre as bactérias e as superfícies quando imersas em água, foi mais negativa para o aço inoxidável AISI 316 ($p < 0,05$), que também apresentou maior ângulo de contato com a água e energia livre mais negativa do que o aço AISI 304. Teixeira et al (2005) avaliando a adesão de *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus sciuri* e *Enterococcus faecalis* em superfícies de aço inoxidável 316, aço inoxidável 304, vidro e polimetilmetacrilato também observaram energias negativas (ΔG_{1w2}^{TOT}) em aço inoxidável 316. Entretanto, os resultados de quantificação de microrganismos aderidos do presente estudo não demonstraram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois tipos de aços inoxidáveis. Este resultado significa que, embora os aspectos termodinâmicos sejam fundamentais para a adesão inicial, outros fatores estão relacionados com a adesão do microrganismo.

Por outro lado, *S. Enteritidis* (SE 86) apresentou energia livre total de adesão (ΔG_{1w2}^{TOT}) mais negativa ($p < 0,05$) do que *L. monocytogenes* em ambos os aços inoxidáveis, o que demonstra que a adesão desta bactéria é termodinamicamente mais favorável para os dois aços inoxidáveis testados, o que também foi confirmado pelos resultados obtidos nos ensaios de quantificação. No entanto, Sinde & Carbaló (2000) mostraram que *L. monocytogenes* aderiu ao aço inoxidável 304 com uma quantidade de células mais elevada do que *Salmonella* spp., embora eles não tenham observado diferenças entre as energias totais de adesão (ΔG_{1w2}^{TOT}) das duas bactérias.

Os resultados do presente estudo demonstraram que as bactérias foram capazes de aderir às superfícies de aço inoxidável AISI 304 e 316 e às soldas MIG e

TIG, sendo que, inicialmente, *S. Enteritidis* (SE 86) aderiu mais do que *L. monocytogenes*.

O maior número de células aderidas no momento inicial é muito importante, uma vez que o período de tempo entre higienizações normalmente praticado em frigoríficos e indústrias de laticínios, geralmente não ultrapassa 8 horas. Além disso, após esta adesão inicial, dependendo das condições do ambiente de processamento *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* podem se multiplicar, formar biofilme e contaminar os alimentos. Além disso, *S. Enteritidis* também revelou energia livre de adesão (ΔG_{lw2}^{TOT}), mais negativa do que *L. monocytogenes*, isso significa que a adesão desta bactéria foi termodinamicamente mais favorável do que a adesão de *L. monocytogenes* em ambos os aços inoxidáveis e soldas. Esse resultado pode explicar a maior taxa de adesão no tempo zero, demonstrado pela *S. Enteritidis* SE86, e pode ser mais um fator que explique porque esse microrganismo tem sido um importante patógeno alimentar no sul do Brasil.

Conforme já foi dito anteriormente, neste trabalho, os tempos de contato utilizados na avaliação da adesão aos aços inoxidáveis foram escolhidos pensando no tempo máximo que uma superfície de contato poderia ficar sem higienização em uma indústria de alimentos. No entanto, os mesmos tempos não foram repetidos para os testes realizados com as soldas, uma vez que não havia corpos de prova (com as mesmas características) suficientes para fazer os experimentos. Por isso, foram escolhidos, além do tempo 0, mais dois tempos que melhor representassem o comportamento das duas bactérias, o qual já havia sido avaliado nos experimentos dos aços, realizado anteriormente. Esses tempos corresponderam aos dois tempos

onde se observou a maior adesão, seguido de uma estabilização, que foram: uma hora, para *S. Enteritidis* SE86, e quatro horas, para *L. monocytogenes*.

Sabendo que as duas bactérias patogênicas são capazes de aderir em uma quantidade relevante às superfícies mais utilizadas nas empresas de alimentos, ou seja, aos aços inoxidáveis AISI 304 e AISI 316 e às soldas MIG e TIG e que embora alguns fatores expliquem os mecanismos de adesão, ainda há mais fatores que precisam ser estudados, a fim de compreender todos os aspectos envolvidos nesta adesão.

A terceira parte deste trabalho buscou uma alternativa no sentido de evitar a adesão, e para isso se utilizou o conhecimento obtido durante as outras fases do trabalho, os quais abordaram com maior ênfase as características das superfícies e dos microrganismos. Nesta fase final, utilizou-se o tratamento de nitretação a plasma com o intuito de alterar a hidrofobicidade das superfícies, como uma alternativa para diminuir ou evitar a adesão de microrganismos.

Este tratamento já tem sido utilizado há muito tempo na área da metalurgia para melhorar características dos metais, como dureza, resistência à corrosão e resistência ao desgaste. Nos últimos anos, porém por ser capaz de alterar a hidrofobicidade das superfícies, também tem sido estudado quanto a sua capacidade de redução da adesão microbiana. No entanto, os trabalhos existentes são realizados em materiais médicos (metais e polímeros) e com microrganismos de importância clínica. Os resultados obtidos nestes trabalhos demonstram uma promissora possibilidade de utilização do tratamento a plasma nos aços inoxidáveis utilizados nas empresas de alimentos, uma vez que é um tratamento viável financeiramente e aplicável em grande escala.

Os resultados obtidos mostraram que os aços tratados por nitretação a plasma apresentaram um menor número de células aderidas ($P < 0,05$), quando comparados com os mesmos aços não tratados. A redução variou de 20% a 37,5% para *L. monocytogenes* e de 31,7% a 65,8% para *S. Enteritidis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Trentin et al (2014) que observaram reduções na adesão de 83% para *Klebsiella pneumoniae*, 77% para *Serratia marcescens*, 65% para *Staphylococcus aureus* e 48% para *Enterobacter cloacae* em poliestireno tratado com nitretação a plasma realizado em condições semelhantes às usadas no presente trabalho. No entanto Lin et al (2011) obtiveram uma redução de 98,8% e 99,9% das *Escherichia coli* (*E. coli*) aderidas no aço inoxidável 303 tratado com nitretação a plasma. A maior redução observada por estes autores pode ser explicada pelas diferentes condições utilizadas, uma vez que a pressão e a energia utilizadas no estudo de Lin et al. (2011) foram maiores do que as utilizados neste estudo (133,3 Pa, 700 W), e o tempo de exposição foi menor (80 min.). Hung et al (2012) também obtiveram redução de 99,9% de *E. coli* aderidas aos aços inoxidáveis 304 e 303 tratados por nitretação a plasma com micro-ondas. No entanto, Dong et al (2011), não observaram redução no número de *E. coli* e *Staphylococcus epidermidis* aderidos à superfície de aço inoxidável AISI 316, tratado com nitretação a plasma, utilizando uma pressão de 4 mbar a 430 °C, durante 15 h. Este resultado pode ser explicado pela baixa porcentagem de nitrogênio utilizado (25%), enquanto que no presente estudo foi utilizado um percentual de 91%.

Observou-se reduções inferiores, em comparação com os resultados de Lin et al (2011) e Hung et al (2012) as quais podem ser devidas às condições de tratamento utilizadas, que foram mais brandas do que as utilizadas por outros

pesquisadores. A principal diferença em comparação com os outros trabalhos foi a densidade de potência e a proporção da mistura de gases que tiveram valores baixos em comparação com os utilizados nas outras pesquisas.

Os valores de hidrofobicidade obtidos para os aços tratados com plasma confirmaram que sob as condições utilizadas neste estudo, foi possível alcançar apenas uma ligeira alteração na hidrofobicidade das superfícies, ou seja, os aços inoxidáveis tratados apresentaram uma característica ligeiramente hidrofílica, o que é significativamente diferente ($p < 0,05$) da hidrofobicidade dos aços inoxidáveis não tratados, mas ainda representa uma mudança muito pequena nas características da superfície. Considerando que as duas bactérias estudadas apresentaram carácter hidrofílico ($\Delta G_{iwi} > 0$) e que sabe-se que a adesão entre superfícies hidrofílicas é mais difícil (TRENTIN et al, 2014), quanto mais hidrofílico for o aço inoxidável menor deve ser a adesão. Os resultados obtidos por Trentin et al (2014) também demonstraram esta relação, uma vez que eles relataram uma redução na adesão de bactérias hidrofílicas e nenhuma redução de uma bactéria hidrofóbica (*S. epidermidis*), quando estudaram a adesão em polietileno tratado por nitretação a plasma.

Os resultados obtidos no presente estudo também demonstraram que a taxa de redução de *S. Enteritidis* foi maior do que a de *L. monocytogenes*, ao passo que os valores obtidos para a hidrofobicidade das bactérias mostrou que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre a hidrofobicidade das duas bactérias. Estes resultados podem ser devido à influência de outras características da *S. Enteritidis*, como a presença de fímbria, *pili* e cápsula que podem estar envolvidas no processo de adesão. Os valores observados para o número de células aderidas aos aços

inoxidáveis não tratados (dados não mostrados) mostraram que *S. Enteritidis* (SE 86) também aderiu mais do que a *L. monocytogenes* nos aços inoxidáveis não tratados. No entanto, os valores da taxa de redução foram maiores para ambas as bactérias no aço inoxidável AISI 316 tratado, que mostrou-se mais hidrofílico (ΔG_{iwi} mais positivo) do que o aço AISI 304 tratado.

Os resultados mostram ainda que a adesão das bactérias foi termodinamicamente menos favorável ($\Delta G_{1w2}^{\text{TOT}}$ menos negativa) em aços inoxidáveis tratados, em comparação com os aços inoxidáveis não tratados. Além disso, a aderência ao aço inoxidável AISI 316 tratado foi menos favorável ($\Delta G_{1w2}^{\text{TOT}}$ menos negativo) do que a do aço inoxidável AISI 304 tratado. Estes resultados corroboram com a AR observada, que foi mais elevada, ou seja, a adesão foi menor no aço inoxidável AISI 316 tratado. Gontijo et al (2007) observaram uma maior solubilidade do nitrogênio em aço inoxidável AISI 316 após o tratamento de nitretação a plasma, quando comparado com o AISI 304 e atribuiu esse fenômeno ao conteúdo de molibdênio do aço inoxidável AISI 316, o que pode explicar o maior caráter hidrofílico, ou seja maior efeito do tratamento de nitretação, observado no aço AISI 316.

Os valores das taxas de redução mostram que o tratamento de nitretação a plasma foi capaz de alterar a superfície, reduzindo a adesão bacteriana. No entanto, as taxas de redução de menos de 90% (1 log), como observado neste estudo e em outros (TRENTIN et al, 2014; HUNG et al, 2012; DONG et al, 2011; LIN et al, 2011) podem não ser suficientes quando os alimentos apresentam alta contaminação bacteriana, uma vez que, geralmente, sanitizantes são capazes de reduzir em torno de 2 a 3 log bactérias e um processo de pasteurização é capaz de

diminuir cerca de 5 a 6 log bactérias (FORSYTHE, 2010). Por outro lado, alimentos de boa qualidade higiênico-sanitária e em condições de processamento reais geralmente apresentam baixa carga de patógenos, e uma redução de 90% na adesão pode ser o suficiente para evitar surtos alimentares.

Por isso o tratamento com plasma é promissor para a modificação de superfícies com objetivo de reduzir a adesão microbiana, não apenas em materiais médicos, mas também em superfícies metálicas que entram em contato com alimentos, no entanto, são necessários mais estudos para obter as melhores condições de tratamento necessárias para atingir maiores taxas de redução de adesão bacteriana.

5. CONCLUSÕES

- *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11) aderiram da mesma forma ao aço inoxidável AISI 304 e ao aço inoxidável AISI 316;
- *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11) aderiram nos dois tipos de solda (MIG e TIG) na mesma proporção;
- *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11) aderiram da mesma forma às superfícies soldadas (MIG e TIG) e às superfícies não soldadas (aço inoxidável sem solda);
- O polimento das soldas não interferiu na adesão de *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11);
- *S. Enteritidis* (SE86) aderiu inicialmente (t 0) significativamente mais que *L. monocytogenes* (J11) em todos os materiais;
- *S. Enteritidis* (SE 86) e *L. monocytogenes* (J11) apresentaram caráter hidrofílico. Os aços inoxidáveis AISI 304 e AISI 316 apresentaram caráter hidrofóbico e os aços inoxidáveis tratados por nitretação a plasma caráter hidrofílico;
- Não foi observada relação entre a hidrofobicidade e a rugosidade das superfícies e a adesão bacteriana nos aços não tratados;

- A adesão de *S. Enteritidis* (SE 86) e *L. monocytogenes* (J11) foi menor no aço AISI 316, o qual após tratamento a plasma apresentou caráter mais hidrofílico do que o AISI 304 tratado;
- A adesão de *S. Enteritidis* aos aços inoxidáveis (tratados e não tratados) foi termodinamicamente mais favorável do que a adesão de *L. monocytogenes*;
- O tratamento a plasma foi capaz de alterar as superfícies, reduzindo a adesão bacteriana, porém em pequenas taxas.

6. PERSPECTIVAS

- Testar outras condições de tratamento a plasma nos aços inoxidáveis (AISI 304 e AISI 316), a fim de obter maiores taxas de redução da adesão;
- Avaliar o efeito do tratamento a plasma nas soldas MIG e TIG sobre a redução da adesão;
- Avaliar a estabilidade do tratamento a plasma aos principais métodos de desinfecção (químicos e físicos) utilizados pela indústria de alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES Jr., C. **Nitreção a Plasma: Fundamentos e Aplicações**, Ed. UFRN, Natal, 2001.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

ARAÚJO de F.O.; SOUSA de, R.S.; ARAÚJO de, A.K.G.; RIBEIRO, K.J.B.; ALVES Jr.,C. Nitreção a plasma de aço inoxidável austenítico AISI 316: uniformidade da camada nitretada. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 26, n. 1, 31-35, 2007.

AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; LIMA, J. C. . Adesão microbiana a superfícies bióticas e abióticas. In: Azevedo, N.F.; Cerca, N.. (Org.). **Biofilmes - Biofilmes na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. 1ed. Porto: Publindustria, v. 01, 2012, p. 279-288.

BAE, Y.; BAEK, S; LEE, S. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**. v.53, p.465–473, 2012.

BOARI, C.B.; ALVES, M.P., TEBALDI, V.M.R., SAVIAN, T.V., PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.29, n.4, p. 886-895, 2009.

BONG JAE, P.; TRAVIS, H.; NEHAL, I. A. A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: An atomic force microscopy study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.73, p.237–243, 2009.

BONSAGLIA, E.C.R.; SILVA, N.C.C.; FERNADES JÚNIOR, A.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; TSUNEMI, V.L.M; RALL, M.H. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, p. 386-391, 2014.

BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Review**. v. 23, p. 179–230, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Atualizado em 2013. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2013.pdf. Acesso em: 25 de fevereiro de 2014.

BUCHANAN, R., LINDQVIST, R., ROSS, T., SMITH, M., TODD, E., WHITING, R. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. In: **Microbiological Risk Assessment Series**, v. 4. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. p. 5-14.

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

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review — persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology** v.145, p.1–8, 2011.

CERCA, N.; PIER, G.B.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Comparative evaluation of coagulase-negative staphylococci (CoNS) adherence to acrylic by a static method and a parallel-plate flow dynamic method. **Research in Microbiology**. v. 155, p. 755-760, 2004.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.103–111, 2000.

CHARACKLIS, W.G. Fouling biofilm development: a process analysis. **Biotechnology Bioengineering**. v. 23, p. 1923-1960, 1981.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. (Eds.). **Biofilms**. New York: John Wiley & Sons, 1990.

CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.-N.; HEBRAUD, M. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p. 728–737, 2002.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho, Braga, 2004.

CHIA, T.W.R.; GOULTER, R.M.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G.A.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, p. 853–859, 2009.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

DAVEY M.E, O'TOOLE G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.64, n. 4, p.847-67, 2000.

DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Acta Physico Chemica URSS**. v.14 , p.633, 1941.

DIN 11480. **Milk processing machinery in dairy processing plants surfaces**. Germany, Koln: Beuth Verlag, 1978.

DONG, Y.; LI, X.; TIAN, L.; BELL, T.; SAMMONS, R.L.; DONG, H. Towards long-lasting antibacterial stainless steel surfaces by combining double glow plasma silvering with active screen plasma nitriding. **Acta Biomaterialia**. v.7, p.447–457, 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOYLE, R. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. **Microbes and Infection**. v. 2, p. 391-400, 2000.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 3, p. 1213-1219, 2003.

DUNNE, W.M. Bacterial Adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

EASTWOOD, C.A., WOODALL, D.L., TIMPERLEY, D.A., CURIEL, G.J., PESCHEL, P. e HAUSER, G. Welding stainless steel to meet hygienic. **Trends in Food & Technology**. Setembro, 1993 Vol.4. Disponível em: <http://www.ehedg.org/guidelines/doc9.pdf>. Acesso em: 29 de dezembro de 2009.

ELIMELECH, M.; GREGORY, J.; JIA, X.; WILLIAMS, R.A. **Particle deposition and aggregation: Measurement, modelling and simulation**. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann. 441 p., 1995.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. **EFSA Journal**, v.8, n.1, p.1496, 2010.

EUROPEAN HYGIENIC ENGINEERING & DESIGN GROUP (EHEDG). Welding stainless steel to meet hygienic requirements. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, p.306-310, 1993.

EUROPEAN HYGIENIC ENGINEERING & DESIGN GROUP (EHEDG). Materials of construction for equipment in contact with food. **Trends in Food Science & Technology**. v.18, p.S40-S50, 2007.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p.623–633, 2010.

FLINT, S.H. Report on an evaluation of seven plasma weld samples. In: W. Scholz, **Stainless steel weld surface finish and biofilm development. Around robin test**. New Zealand Welding Center Report R8-14, (Section 5, pp. 1-7). Manukau City, New Zealand, 1996.

FLINT, S.H.; BROOKS, J.D.; BREMER, P.J. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**. v.43, n.4, p.235-242, 2000.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**, Second edition. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. 476p.

FRANK, J. F.; CHMIELEWSKI, R. A. N. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v.2, p. 22-32, 2003.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.1, p.1-15, 2007.

GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, p.1049-1056, 2008.

GONTIJO, L.C.; MACHADO, R.; CASTELETTI, L.C.; KURI, S.E.; NASCENTE, P.A.P. Comparação entre os comportamentos dos aços inoxidáveis AISI 304l e AISI 316l nitretados a plasma. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**. v.26, n. 3, 145-150, 2007.

GOTTENBOS, B. et al. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.3, n. 8, p.717-722, 2002.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H.. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**. V.14, p.734–740, 2008.

HARIMAWAN, A.; ZHONG, S.; LIM, C.; TING, Y. Adhesion of *B. subtilis* spores and vegetative cells onto stainless steel – DLVO theories and AFM spectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.405, p.233–241, 2013.

HOLAH, J. T.; THORPE, R. H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Microbiology**, v.69, n. 4, p. 599-608, 1990.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, n. 2/3,145-153, 1997.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 424-434, 2010.

HUNG, C. F.; WU, C. Z.; LEE W. F.; OU, K. L.; LIU, C. M.; PENG, P. W. The Effect of Nitrided Layer on Antibacterial properties for Biomedical Stainless Steel. **Physics Procedia**, v. 32 , p. 914 – 919, 2012.

JENSEN, A.K.; ETHELBERG, S.; SMITH, B.; NIELSEN, E.M., LARSSON, J.; MØLBAK, K.; CHRISTENSEN, J.J.; KEMP, M. Substantial increase in listeriosis, Denmark 2009. **Euro Surveillance**. v.15, n.12, 2010. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19522>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2014.

JULLIEN, C.; BENEZECK, T; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**. v.56, p.77–87, 2002.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y .F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial and techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 37-57, 2004.

KIM, S.K.; YOO, J.S.; PRIEST, J.M.; FEWELL, M.P. Characteristics of martensitic stainless steel nitrided in a low-pressure RF plasma. **Surface and Coatings Technology**. v.163 – 164, p.380–385, 2003.

KIM, H., RYU, J.H., BEUCHAT, L.R. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5846–5856, 2006.

KUSUMANINGRUM H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, n. 3, p. 227-236, 2003.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.594–605, 2000.

LEWAN, M. **Hygiene in Food Processing** (2 ed.), Cambridge: **Woodhead Publishing Limited**. 2014, p. 142–154.

LIN, LI-HSIANG; CHEN, SHIH-CHUNG; WU, CHING-ZONG; HUNG, JING-MING; OU, KENG-LIANG. Microstructure and antibacterial properties of microwave plasma nitrided layers on biomedical stainless steels. **Applied Surface Science**. v. 257, p.7375–7380, 2011.

LUNDEN, J.M.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**. V.65, p.1129–1133, 2002.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**. v.53, p.742–746, 1990.

MARSHALL, K.C. **Interfaces in microbial ecology**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1976, 156 p.

MARSHALL, K.C.; BLAINEY, B. L. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: FLEMMING, H-C; GEESEY, G G. (Eds.) **Biofouling and biocorrosion in industrial water systems**. Heidelberg: Springer, p. 29-45, 1990.

MARSHALL, D.L., ANDREWS, L.S.; WELLS, J.H.; FARR, A.J. Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. **Food Microbiology**. v. 9, p. 303-309, 1992.

MARTINS, C.M.B.; MOREIRA, J.L.; MARTINS, J.I. corrosion in water supply pipe stainless steel 304 and a supply line of helium in stainless steel 316. **Engineering Failure Analysis**, v.39, p. 65–71, 2014.

MITTELMAN, M.W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 2760-2764, 1998.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M.C.; LONGARAY, S.M.; BOTH, J.M.C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, p.529-534, 2008.

New Zealand Dairy Industry Manual. NZCP6: **Design and layout of manufacturing premises. Section 8: General Requirements for Equipment** (page 8.5, Subsection 8.3.2 Surface Finish). New Zealand Dairy Board, New Zealand., 1995.

NOVELLO, J. C. de L. **Implantação de íons de prata em aço inoxidável e Infecção fágica para o controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos**. Viçosa, MG: UFV, 2012, Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2012.

NOTERMANS, S.; DORMANS, J.A.M.A.; MEAD, G.C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants. **Biofouling**, v.5, p.21-36, 1991.

OLIVEIRA, R. **Fenómenos Interfaciais**. Braga: Universidade do Minho, 2001. 126 p.

OLIVEIRA, K.M.P. **Adesão de Salmonella Enteritidis em diferentes superfícies de processamento de alimentos**. Londrina, PR: UEL, 2006. 113p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.

OLIVEIRA, F.A.; FRAZZON, A.P.G.; BRANDELLI, A.; TONDO, E.C. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**. v.1, p.170-176, 2007.

OLIVEIRA, F. A.; GEIMBA, M.P.; PASQUALOTTO, A.P.; BRANDELLI, A.; PAQUALI, G.; SILVA, W.P.; TONDO, E.C. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, v.20, p.606–610, 2009.

ORTIZ, S.; LÓPEZ, V.; VILLATORO, D.; LÓPEZ, P. D. J.; CARLOS, M.S.; JOAQUÍN, V. A 3-years surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.7, n.10, 2010.

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

PONCIN-EPAILLARD, F.; HERRY, J.M.; MARMEY, P.; LEGEAY, G.; DEBARNOT, D.; BELLON-FONTAINE, M.N. Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface - a potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria? **Materials Science and Engineering C**. v.33, p.1152–1161, 2013.

RIO GRANDE DO SUL. SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatórios Anuais de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Porto Alegre, 2006. 21p.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n. 1, p.81-85, 2000.

RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.247–254, 2005.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, v.13, n. 6-7, 469-477, 2002.

SHARMA, P.K.; HANUMANTHA RAO, K. Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 29, p. 21-38, 2003.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Food Science and Technology**, v.20, p.407-413, 2009.

SILVA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**. v.71, p.1379–1385, 2008.

SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. **Food Microbiology**. v.35, p.65-72, 2013.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. And *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v.17, n. 4, p.439-447, 2000.

SOMMER, P.; MARTIN-ROUAS, C.; METTLER, E. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. **Food Microbiology**. v.16, p. 503–515, 1999.

STEWART, P. S. Biophysics of biofilm infection. **Pathogens and Disease**. v. 70, p.212–218, 2014.

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

SZLAVIK, J.; PAIVA, D.S.;1, MØRK, N.; VAN DEN BERG, F.; VERRAN, J.; WHITEHEAD, K.; KNØCHEL, S.; NIELSEN, D.S. Initial adhesion of *Listeria*

monocytogenes to solid surfaces under liquid flow. **International Journal of Food Microbiology**, v.152, p.181–188, 2012.

TAKAHASHI, H; MIYA, S; IGARASHI, K; SUDA, T; KURAMOTO, S; KIMURA, B. Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. **Journal of Food Protection**, v.72, n.7, p.1476-1480, 2009.

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

THOUVENIN, M.; LANGLOIS, V.; BRIANDET, R.; LANGLOIS, J.Y.; GUERIN, P.H.; PERON, J.J.; HARAS, D.; VALLE-REHEL, H. Study of erodable paint properties involved in antifouling activity. **Biofouling**. v. 19, p. 177-186, 2003.

TIDE, C.; HARKIN, S.R.; GEESEY, G.G.; BREMER, P.J.; SCHOLZ, W. The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. **Journal of Food Engineering**, v.42, p.85-96, 1999.

TONDO, E. C.; MACHADO, Tais Raquel Marcon; MALHEIROS, P. S.; PADRAO, D. K.; Carvalho, A. L.; BRANDELLI, A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 10-20, 2010.

TONDO, E.C.; RITTER, A.C. Salmonella and Salmonellosis in Shouthern Brazil: A Review of the Last Decade. In: **Salmonella Classification, Genetics and Desease Outbreacks**. Nova lorque: Nova Science Publishers Inc., 2012. p. 175-181.

TRENTIN, D.S; BONATTO, F.; ZIMMER, K.R.; RIBEIRO,V.B.; ANTUNES, A.L.S.; BARTH, A.L.; SOARES, G.V.; KRUG,C.; BAUMVOL, I.J.R.; MACEDO, A.J. N2/H2 plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. **Surface & Coatings Technology**, in press, 2014.

VALCARCE, M.B.; BUSALMEN, J.P.; SÁNCHEZ, S.R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p. 61-66, 2002.

VAN DER MEI, H.C.; BOS, R.; BUSSCHER, H. J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 11, n. 4, p. 213-221, 1998.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M. *et al.* The role of 22. bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1893-1897, 1987.

VAN OSS, C.J. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. **Colloids and Surfaces A**. v. 78, p.1-49, 1990.

VAN OSS, C.J. The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles-their determination and relatives roles. **Biofouling**. v. 4, p. 25-35, 1991.

VAN OSS, C.J. Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.5, p.91-11, 1995.

VAN OSS, C.J. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and a specific interactions, **Journal of Molecular Recognition**. v.16, p.177-190, 2003.

VAN OSS, C.; CHAUDHURY, M; GOOD, R. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. **Chemical Reviews**. v.88, p.927-941, 1988.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F.; COSTANZO, P.M. DLVO and non-DLVO interactions in hectorite. **Clays Clay Minerals**. v. 38, p. 151-159, 1990.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays Clay Mineral**, v. 43, n. 4, p. 474-477, 1995.

VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. Th. G. **Theory of the stability of lyophobic colloids**, Amsterdam: Elsevier, p. 203, 1948.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**. v. 74, p. 69-117, 1998.

WALSH, D.; POPE, D.; DANFORD, M.; HU, T. The effect of microstructure on microbially influenced corrosion. **Journal of Mineral, Metal and Material Society**. v.45, n.9, p.22-30, 1993.

WILKS, S. A.; MICHELS, H. T.; & KEEVIL, C. W. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.93-98, 2006.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

WONG, A.C. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2765–2770, 1998.

XAVIER, J.B. *et al.* Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v.1, p.1-12, 2005.

ZHAO, Q.; LIU, Y.; WANG, C.; WANG, S.; PENG, N.; JEYNES, C. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Medical Engineering & Physics**, v.30, p. 341–349, 2008.