



MARIA CECÍLIA ENES RIBEIRO

**ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Bacillus cereus*
EM AÇO INOXIDÁVEL**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIA CECÍLIA ENES RIBEIRO

**ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Bacillus cereus*
EM AÇO INOXIDÁVEL**

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do
título de Doutora em Tecnologia de Alimentos*

Orientadora: Mirna Lúcia Gigante

Este exemplar corresponde à versão final da tese
defendida pela aluna Maria Cecília Enes Ribeiro
e orientada pela Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante



Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2015

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

R354a Ribeiro, Maria Cecília Enes, 1986-
Adesão e formação de biofilme por *Bacillus cereus* em aço inoxidável / Maria Cecília Enes Ribeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Mirna Lucia Gigante.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bacillus cereus*. 2. Esporos. 3. Biofilme. 4. Higienização. I. Gigante, Mirna Lucia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* on stainless steel

Palavras-chave em inglês:

Bacillus cereus

Spores

Biofilm

Sanitation

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Mirna Lucia Gigante [Orientador]

Marcilia Santos Rosado Castro

Maristela da Silva do Nascimento

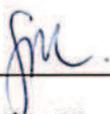
Luciana Maria Ramires Esper

Salvador Massaguer Roig

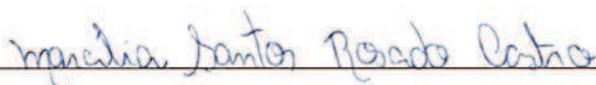
Data de defesa: 17-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA



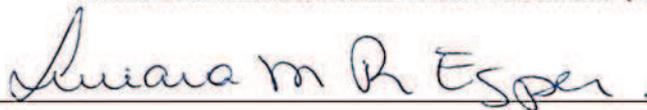
Prof. Dra. Mirna Lúcia Gigante (Orientadora)



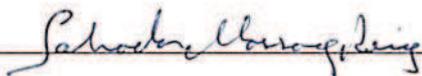
Prof. Dra. Marcília Santos Rosado Castro (Membro Titular)



Prof. Dra. Maristela da Silva do Nascimento (Membro Titular)



Prof. Dra. Luciana Maria Ramires Esper (Membro Titular)



Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig (Membro Titular)

Prof. Dra. Emiliane Andrade de Araújo (Membro Suplente)

Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá (Membro Suplente)

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye (Membro Suplente)

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes matrizes na adesão e formação de biofilme em aço inoxidável por *Bacillus cereus*, bem como avaliar a eficiência dos procedimentos de higienização no controle de biofilmes de esporos desse micro-organismo. Nas duas primeiras etapas, avaliou-se a capacidade de adesão e formação de biofilme por *B. cereus* em aço inoxidável, com e sem prévio condicionamento da superfície, utilizando-se água, leite UHT desnatado e integral como matrizes e quatro diferentes tipos de inóculos, *pool* de células vegetativas de *B. cereus* isolados da indústria láctea, *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea, células vegetativas da cepa de *B. cereus* ATCC 14579 e esporos da cepa de *B. cereus* ATCC 14579. Na terceira etapa do trabalho avaliou-se a influência da matriz condicionante (água e leite UHT integral), do meio de inoculação do *pool* de esporos de *B. cereus* (água e leite UHT integral) e do tempo de exposição (5 min (0,08h), 10, 24, 48 e 72 horas) sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* em aço inoxidável. Na quarta etapa, avaliou-se a eficiência de nove procedimentos de higienização na remoção dos biofilmes formados pelo *pool* de esporos de *B. cereus* em aço inoxidável. Todos os experimentos foram repetidos três vezes e os dados estatisticamente avaliados. A hidrofobicidade e o potencial zeta das superfícies dos esporos também foram avaliados. Os resultados das duas primeiras etapas indicaram que o *pool* de esporos de *B. cereus* isolados de indústria láctea apresentou a maior capacidade de adesão e formação de biofilme em aço inoxidável quando comparado aos outros tipos de inóculos, em todas as condições avaliadas. O maior grau de adesão de esporos de *B. cereus* (4,93 log UFC/cm²) foi observado ao se utilizar leite integral como matriz condicionante do aço inoxidável. Entretanto, sem o prévio condicionamento da superfície, uma menor adesão foi observada (3,01 log UFC/cm²) quando o *pool* de esporos de *B. cereus* foi veiculado no leite integral ao se comparar todas as matrizes. Na terceira etapa do trabalho observou-se que a adesão e formação de biofilme pelo *pool* de esporos de *B. cereus* foi maior quando inoculados em água, independente das matrizes de condicionamento. A adesão de *B. cereus* aumentou 1,02 e 0,3 log UFC/cm² ao longo do tempo de exposição, quando o *pool* de esporos de *B. cereus* foi inoculado em água e leite integral, respectivamente. O biofilme de esporos veiculados na água apresentou maior resistência aos procedimentos de higienização. A sanitização com

hipoclorito de sódio foi mais eficiente na remoção dos biofilmes quando comparada ao ácido peracético. O *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea foi altamente hidrofóbico e apresentou carga negativa em uma ampla faixa de pH, com ponto isoelétrico de aproximadamente 3,0. Os esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea apresentaram maior capacidade de adesão ao aço inoxidável quando comparados aos outros inóculos avaliados, o que pode estar relacionado à alta hidrofobicidade e a baixa carga de superfície dos esporos.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, esporos, biofilme, higienização.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different matrices on the adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* on stainless steel, and to evaluate the effectiveness of sanitation procedures for controlling biofilm from spores of this microorganism. The first two parts were carried out in order to evaluate the adhesion and biofilm formation by *B. cereus* on stainless steel, with and without previous conditioning of the surface, using water, skim and whole UHT milk as matrices and four different types of inocula: a pool of *B. cereus* vegetative cells isolated from dairy industry, a pool of *B. cereus* spores isolated from dairy industry, vegetative cells of *B. cereus* ATCC 14579, and spores of *B. cereus* ATCC 14579. The third part of the study evaluated the effect of the conditioning matrix (water and whole UHT milk), the inoculation medium of pool of *B. cereus* spores (water and whole UHT milk) and exposure time (5 min (0.08h), 10, 24, 48 and 72 hours) on the adhesion and biofilm formation by *B. cereus* on stainless steel. In the fourth part, the effect of nine sanitation procedures on the removal of *B. cereus* spores biofilm was evaluated. All experiments were repeated three times and data were statistically evaluated. Hydrophobicity and zeta potential from spore's surface were also evaluated. Regarding the results to the first and second parts, the pool of *B. cereus* spores isolated from dairy industry had the highest ability of adhesion on stainless steel when compared to the other inocula, for all tested conditions. After stainless steel surface conditioning with whole milk, *B. cereus* spores showed the highest adhesion (4.93 log CFU/cm²). However, lower adhesion (3.01 log CFU/cm²) was observed when *B. cereus* spores were delivered in whole milk as compared to the other matrices, without previous conditioning of the surface. The results of the third part indicated that the adhesion and biofilm formation by the pool of *B. cereus* spores was higher when they were inoculated in water, regardless of the conditioning matrix. *B. cereus* spores adhesion increased by 1.02 and 0.3 log CFU/cm² over exposure time, when the pool of *B. cereus* spores was inoculated into water and whole milk, respectively. Biofilm of *B. cereus* spores inoculated in water showed the highest resistance against all tested sanitation procedures. Sodium hypochlorite was the most effective sanitizer for removing all biofilms when compared to the peracetic acid. The pool of *B. cereus* spores isolated from dairy industry was highly hydrophobic and showed a negative charge at a wide pH range, with an isoelectric point of about 3.0. *B. cereus*

spores isolated from dairy industry showed the highest ability to adhere on stainless steel when compared to the other inocula, which is possibly related to its higher hydrophobicity and lower spore surface charge.

Keywords: *Bacillus cereus*, spores, biofilm, sanitation.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Bacillus cereus</i>	3
2.2 Adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos	7
2.3 Controle da formação de biofilmes e influência das etapas de higienização.....	13
2.3.1 Ácido Peracético	16
2.3.2 Hipoclorito de sódio.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Origem dos isolados.....	21
3.2 Preparo das células vegetativas.....	22
3.3 Preparo da suspensão de esporos	23
3.4 Caracterização e preparo da superfície de aço inoxidável	24
3.5 Material e descrição das etapas do trabalho.....	25
3.5.1 Material	25
3.5.2 Adesão de <i>B. cereus</i> em aço inoxidável pré-condicionado com diferentes matrizes	26
3.5.3 Adesão de <i>B. cereus</i> em aço inoxidável sem pré-condicionamento da superfície.	28
3.5.4 Adesão de esporos de <i>B. cereus</i> em aço inoxidável pré-condicionado ao longo do tempo de exposição	30
3.5.5 Avaliação de procedimentos de higienização na remoção de biofilmes de esporos de <i>B. cereus</i>	32
3.5.6 Determinação do número de células aderidas	35
3.6 Caracterização físico-química da superfície dos esporos	36
3.6.1 Avaliação do Potencial Zeta.....	36
3.6.2 Avaliação da hidrofobicidade.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Adesão de <i>B. cereus</i> em aço inoxidável pré-condicionado com diferentes matrizes .	38
4.2 Adesão de <i>B. cereus</i> em aço inoxidável sem pré-condicionamento da superfície.....	43

4.3 Adesão de esporos de <i>B. cereus</i> em aço inoxidável pré-condicionado ao longo do tempo de exposição.....	48
4.4 Avaliação de procedimentos de higienização na remoção de biofilmes de esporos de <i>B. cereus</i>	57
4.5 Características físico-químicas da superfície dos esporos	67
4.5.1 Potencial Zeta.....	67
4.5.2. Hidrofobicidade.....	69
5. CONCLUSÕES	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO 1	89

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Newton e Maria José pelo amor, incentivo,
oportunidade e compreensão. Dedico!*

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho”*

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde, sabedoria e principalmente forças para superar cada dificuldade encontrada na longa jornada deste trabalho;

Aos meus familiares, em especial aos meus pais e minha irmã, por todo apoio, incentivo, forças e amor incondicional que me deram durante esta caminhada;

À Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante pela oportunidade, orientação, compreensão, apoio, confiança, ensinamentos transmitidos e, sem dúvida por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses seis anos de mestrado e doutorado;

Ao Prof. Dr. Arnaldo Kuaye pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho e por disponibilizar o Laboratório de Higiene, que foi imprescindível para a realização do mesmo, além da permissão e colaboração da Profa. Dra. Maristela da Silva do Nascimento;

À Meg, pelos ensinamentos, apoio, amizade, divertimentos e pela “doação” das cepas de *Bacillus cereus* utilizadas neste trabalho;

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade, correções e sugestões na redação da tese;

À Bete, técnica do Laboratório de Leite, à Diana, técnica do Laboratório de Higiene, à Yara, técnica do Laboratório de Microestrutura de Alimentos, à Aline, técnica do Laboratório de Microbiologia e à Ana Lourdes, pela amizade, atenção e ajuda nos momentos de dúvida;

Aos amigos do Laboratório de Leite (Juliana, Carol, Ana Barth, Carol Merheb, Rodolfo, Sarah, Willian, Laís, Gui, Clarice, Mônica, Veridiana) pela força, amizade, convivência, seja nas alegrias ou tristezas;

À Karina, que esteve sempre presente mesmo de longe, me ajudando e apoiando e, por ser uma amiga tão especial para todas as horas;

À Lígia, Diogo e Vitor Rubim pela amizade, apoio e compreensão diante dos mesmos momentos vividos e por torná-los mais leves;

À May e Débora, pela ajuda, apoio, convivência, risadas, choros e sem dúvida pela valiosa amizade;

Aos amigos da FEA (Camila, Vitor Vidal, Ana, Saory, Alexandre, Joyce, Erick, Ju, Teca, Francisco, Talitinha, Vanessa, Bruna, Lud), em especial à Graciela, Simone e Karol, pela amizade desde o início do mestrado e por todos os momentos que passamos juntas;

Aos colegas da pós-graduação, por toda amizade e companheirismo;

Aos funcionários por toda ajuda e apoio técnico concedidos durante a realização dos meus experimentos;

Às amigas de Barretos e de graduação, Menda, Rafa, Maiza, Paula, Rê, Dani, Lah, que mesmo longe, me apoiaram e incentivaram;

Aos amigos Marcília e Wellington, pela amizade e apoio, e principalmente por levarem um pouquinho de Minas para os meus pais com a ajuda contagiante do Ângelo;

À Vivi, amiga especial que encontrei num lugar tão distante e no momento que eu mais precisava, agradeço sua alegria contagiante, ajuda, apoio e amizade;

Ao Marcos pelo apoio, compreensão e companheirismo;

A todos os amigos que conquistei aqui em Campinas e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

A todos os técnicos e funcionários da FEA, em especial os do DTA;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida;

À oportunidade concedida pelo Prof. Dr. Rafael Jimenez-Flores, por me permitir trabalhar em seu laboratório;

Aos amigos que conquistei em San Luis Obispo no período de maior crescimento pessoal e profissional da minha vida, Haotian, Garrett, Valerie, Stephanie, Tracey, May, Hadi, Emily, Cherry, Corbin, Andrea, Kristina, Matt Debbie, Martin, Kaitlyn, Megan, Gaylle, Oya, Vandna, Pilar, que tanto me ajudaram;

A todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização de mais uma etapa.

Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas envolvidas na formação de biofilmes.	9
Figura 2. Esquema geral dos experimentos para avaliar o efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes e do tipo de inóculo sobre a adesão e formação de biofilmes por células vegetativas e esporos de <i>B. cereus</i>	28
Figura 3. Esquema geral dos experimentos para avaliar o efeito do tipo de matriz e do tipo do inóculo sobre a adesão e formação de biofilmes por células vegetativas e esporos de <i>B. cereus</i>	30
Figura 4. Esquema geral dos experimentos para avaliar o efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes, do meio de inoculação do pool de esporos de <i>B. cereus</i> , do tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i>	31
Figura 5. Efeito da interação entre as matrizes de condicionamento do aço inoxidável e o tipo de inóculo sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i> , para (a) contagem total de células (log UFC/cm ²) e (b) contagem de esporos (log UFC/cm ²), (n=3).	39
Figura 6. Efeito da interação entre o tipo de matriz e o tipo de inóculo sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i> , para (a) contagem total de células (log UFC/cm ²) e (b) contagem de esporos (log UFC/cm ²), (n=3).	45
Figura 7. Efeito das (a) matrizes de condicionamento, (b) meios de inoculação e (c) tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i> , avaliado por contagem total de células e contagem de esporos (log UFC/cm ²) (n = 3).	50
Figura 8. Efeito da interação entre os meios de inoculação e o tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i> , para (a) contagem total de células e (b) contagem de esporos, em log UFC/cm ² (n=3).	52
Figura 9. Desenvolvimento da adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i> , avaliada por contagem total de células e contagem de esporos, expressas em log UFC/cm ² , para os meios de inoculação ao longo do tempo de exposição.	54
Figura 10. Efeito da interação entre as matrizes de condicionamento e os meios de inoculação sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i> , avaliado por contagem de esporos, em log UFC/cm ² (n=3).	55
Figura 11. Efeito da interação entre as matrizes de condicionamento e o tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i> , para contagem total de células, em log UFC/cm ² (n=3).	56
Figura 12. Efeito dos procedimentos de limpeza e sanitização sobre a remoção do (a) biofilme água/água, (b) biofilme água/leite integral, (c) biofilme leite integral/água, (d) biofilme leite integral/leite	

integral formados pelo *pool* de esporos de *B. cereus*, avaliado por contagem de esporos, em log UFC/cm² (n=3). 59

Figura 13. Potenciais zeta das suspensões de esporos de *B. cereus* em função da faixa de pH de 2 a 7..... 67

Figura 14. Porcentagem de hidrofobicidade das suspensões de esporos de *B. cereus*..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das doenças transmitidas por <i>B. cereus</i>	4
Tabela 2. Características das culturas isoladas do processamento de ricota e utilizadas na formação do biofilme de <i>B. cereus</i>	22
Tabela 3. Procedimentos de limpeza e sanitização utilizados na remoção de biofilme de esporos de <i>B. cereus</i>	33
Tabela 4. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes, do tipo de inóculo, e da interação entre esses fatores sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i>	38
Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do efeito das matrizes, do tipo de inóculo, e da interação entre esses fatores sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i>	44
Tabela 6. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do efeito das matrizes de condicionamento do aço inoxidável, dos meios de inoculação, do tempo de exposição e das interações entre esses fatores sobre a adesão e formação de biofilme por <i>B. cereus</i>	49
Tabela 7. Ponto isoelétrico das suspensões de esporos de <i>B. cereus</i> (n=2).....	68

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de bactérias formadoras de esporos do gênero *Bacillus* tem sido associada a produtos lácteos, uma vez que podem sobreviver à maioria dos tratamentos térmicos utilizados no processamento. Dentre as espécies desse gênero, a presença de *Bacillus cereus* tem sido associada à deterioração, além de causarem doenças transmitidas via alimentos, acarretando em possíveis problemas de saúde pública (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010), e prejudicando assim a qualidade e segurança microbiológica dos produtos lácteos (FAILLE; FONTAINE; BÉNÉZECH, 2001).

Esse micro-organismo, na forma de células vegetativas ou esporos, possui a capacidade de adesão e formação de biofilme. Os esporos, por estarem dispersos no ambiente, como solo, ar e água, podem facilmente contaminar alimentos e superfícies, apresentando como importante característica a resistência ao tratamento térmico e aos agentes químicos empregados durante a higienização (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008a). Além disso, a proteção conferida pela estrutura do biofilme e da capa presente na superfície dos esporos confere maior resistência aos tratamentos térmicos e procedimentos de higienização quando comparado às células vegetativas (MITCHELL et al., 2008).

A composição e a estrutura dos biofilmes dependem de uma ampla variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como espécie do micro-organismo, pH, presença de sais e nutrientes, meios de cultivo, temperatura do processo, condições de fluxo de processamento (MCLANDBOROUGH et al., 2006). No que diz respeito ao micro-organismo, diversos fatores estão envolvidos diretamente na sua adesão em diferentes superfícies, tais como hidrofobicidade, carga de superfície, e aparatos celulares como fímbrias, pili e flagelos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; WILLIAMS; FLETCHER, 1996; LI et al., 2009).

Um dos fatores mais preocupantes para a indústria láctea é a capacidade de formação de esporos por *B. cereus*, uma vez que sua presença em biofilmes confere maior resistência à remoção por procedimentos de higienização quando comparados as células vegetativas (PENG; TSAI; CHOU, 2002; CARLIN et al., 2010). Uma das principais estratégias utilizadas no controle de biofilmes é a higienização, que consiste no uso combinado de detergentes e sanitizantes (FORSYTHE, 2013). Os processos de higienização de superfícies tornam-se mais difíceis e menos eficientes com a presença de micro-organismos aderidos, sendo este um potencial problema, principalmente nos procedimentos de higienização de

equipamentos que apresentem locais de difícil acesso que facilitam o processo de adesão (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

B. cereus foi selecionado para avaliar a adesão e formação de biofilmes no presente estudo por ser um dos parâmetros microbiológicos a ser pesquisado para leite em pó e outros produtos lácteos na Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001). Estudos anteriores relataram a adesão e formação de biofilmes em plantas de processamento de leite e produtos lácteos por *B. cereus* (WIJMAN et al., 2007; SHI; ZHU, 2009; SALUSTIANO et al., 2010; MALEK, 2012; PEÑA et al., 2014).

O objetivo geral do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes matrizes na adesão e formação de biofilme em aço inoxidável por células vegetativas e esporos de *B. cereus*, bem como avaliar a eficiência dos procedimentos de higienização na remoção de biofilmes de esporos desse micro-organismo. Avaliou-se também as características físico-químicas das superfícies dos esporos, como hidrofobicidade e carga elétrica e sua relação com a adesão e formação de biofilme por esporos de *B. cereus*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por meio de flagelos peritríquios, formador de esporos termorresistentes, que podem ser centrais ou subterminais (FRANCO; LANDGRAF, 2002). A temperatura mínima de crescimento se encontra na faixa de 4 a 12 °C e a temperatura máxima em torno de 48 a 55 °C, sendo que geralmente são mesófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 37 °C. A faixa de pH na qual se multiplicam está situada entre 4,3 e 9,3 (BATT, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

É responsável por dois tipos de doenças transmitidas via alimentos, a “síndrome emética” e a “síndrome diarreica”. Na forma emética, a produção de toxinas ocorre no próprio alimento e é comumente associada com o consumo de arroz e outros alimentos farináceos nos quais os esporos sobrevivem ao cozimento, germinam e, uma vez que permanecem tempo suficiente em temperaturas moderadas, crescem consequentemente produzindo toxinas (BLACKBURN; McCLURE, 2009).

A síndrome diarreica é causada pela ingestão de células e esporos que produzem enterotoxinas no intestino delgado, caracterizadas por duas toxinas termolábeis, a hemolisina BL (HBL) e a não hemolítica (NHE) (CARLIN et al., 2010). A diarreia está relacionada ao rompimento da integridade da membrana plasmática das células epiteliais no intestino delgado e está mais frequentemente associada à ingestão de carnes, vegetais, molhos e produtos lácteos (BLACKBURN; McCLURE, 2009). O consumo de alimentos contaminados, apresentando contagens superiores a 10^5 células de *B. cereus* por grama de alimento têm sido associados com surtos alimentares (RAJKOWSKI; BENNETT, 2003). As características das duas síndromes estão apresentadas na Tabela 1.

Além da importância da segurança de alimentos, *B. cereus* está associado com a deterioração de leite e produtos lácteos, uma vez que produzem enzimas capazes de degradar esses produtos, como proteases, lipases e lecitinases (SCHMIDT et al., 2012). Esporos sobreviventes à pasteurização podem germinar, multiplicar e causar o defeito em leite pasteurizado conhecido como “*bitty cream*”, que resulta na agregação dos glóbulos de gordura do leite em consequência da ação da enzima lecitinase, que hidrolisa os fosfolipídios presentes na membrana do glóbulo de gordura (BLACKBURN; McCLURE, 2009; DE

JONGHE et al., 2010). Outro defeito típico de leite fluido é conhecido como “*sweet curdling*”, e tem sido associado à presença de proteases extracelulares termorresistentes produzidas por algumas cepas de *B. cereus* (RAY, 2003). As principais consequências da contaminação por *B. cereus* em leite e produtos lácteos incluem a redução da vida útil, defeitos na textura e a presença de *off-flavors* nos produtos (FROMM; BOOR, 2004; LÜCKING et al., 2013).

Tabela 1. Principais características das doenças transmitidas por *B. cereus*.

Característica	Síndrome emética	Síndrome diarreica
Dose	10 ⁵ - 10 ⁸ UFC/g alimento	10 ⁵ -10 ⁷ células totais consumidas
Sítio de produção da toxina	Alimento	Intestino delgado
Sintomas	Náuseas e vômitos, possivelmente diarreia	Dores abdominais, diarreia, ocasionalmente náusea
Tempo de incubação	1-5 h	8-16 h
Duração dos sintomas	6-24 h	12-24 h
Características das toxinas	Peptídeos pequenos, termorresistente, estável ao ácido, hidrofóbica, estável a protease, não imunogênica	Pelo menos duas enterotoxinas estão envolvidas, sensíveis ao calor e proteases, imunogênicas
Alimentos mais comuns	Arroz reaquecido, produtos farináceos	Produtos cárneos, sopas, molhos, pudins e produtos lácteos

Fonte: BLACKBURN; McCLURE, 2009.

Bactérias formadoras de esporos são importantes contaminantes nas indústrias lácteas, principalmente do ponto de vista de segurança microbiológica e qualidade dos produtos, além de possíveis perdas econômicas. O controle dessas bactérias no processamento e produto final é ainda considerado uma tarefa difícil, uma vez que o conhecimento sobre sua origem e características como sua termorresistência, potencial de deterioração, toxicidade, é geralmente limitado (LUCKING et al., 2013).

Devido ao risco à saúde pública e sua associação com a deterioração de leite e produtos lácteos, diversos estudos têm investigado a ocorrência de *B. cereus* em produtos, tais como leite cru, pasteurizado, UHT (do inglês, *Ultra High Temperature*) e iogurte (BARTOSZEWICZ; HANSEN; SWIECICKA, 2008; BLEL et al., 2008; CHITOV; DISPAN; KASINRERK, 2008; BANYKÓ; VYLETĚLOVÁ, 2009; DE JONGHE et al., 2010; RATHER et al., 2011; FAILLE et al., 2014).

A incidência de *B. cereus* em produtos lácteos foi avaliada em 293 amostras obtidas de um mercado local em Taiwan. Esse micro-organismo estava presente em 17% dos leites fermentados, 52% dos sorvetes, 35% de sorvetes tipo “soft”, 2% de leite pasteurizado e 29% de leite em pó com níveis variando de 5 a 800 UFC/mL ou UFC/g (WONG; CHANG; FAN, 1988).

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

Malek (2012) afirma que existe uma ampla disseminação de *B. cereus* (10 a 21%) em ambientes de processamento de produtos lácteos, uma vez que diversos pontos de contaminação foram identificados ao longo de uma linha de produção de cinco indústrias lácteas. A contaminação desse micro-organismo, principalmente em leite pasteurizado pode ser proveniente de diversas fontes, tais como leite cru, superfícies de processamento e materiais de embalagens.

Um dos fatores mais preocupantes para a indústria láctea é a capacidade de formação de esporos por *B. cereus* que são extremamente resistentes ao calor, agentes químicos, ampla faixa de pH, desidratação, irradiação e outros estresses ambientais, o que favorece a contaminação desse micro-organismo em produtos, uma vez que estão amplamente distribuídos no meio ambiente (GRANUM; LUND, 1997; CARLIN et al., 2010).

Svensson et al. (2004) coletaram leite cru de tanques de oito diferentes plantas de processamento e observaram elevado número de esporos de *B. cereus*. A presença de algumas cepas foi relacionada aos diferentes ambientes das indústrias, enquanto que certas cepas podem ser selecionadas devido ao ambiente encontrado nos tanques. Os autores relataram que provavelmente o sistema de limpeza dos tanques não era satisfatório devido à elevada resistência ao calor dessas cepas (

Esporos são estruturas dormentes, com um núcleo central protegido do ambiente externo por uma espessa camada de proteína e córtex. A camada de proteína é extremamente resistente a danos químicos ou à radiação, e o córtex possui a função de proporcionar baixa atividade de água em torno do núcleo, por meio da diferença de pressão osmótica entre o córtex e o protoplasma ou expansão do córtex sobre o protoplasma, o que pode explicar sua alta resistência ao calor (BLACKBURN; McCLURE, 2009). Além disso, a membrana externa e a capa do esporo possuem proteínas e carboidratos e, algumas espécies de *Bacillus* sp. possuem uma estrutura externa à capa, que pode apresentar apêndices, chamada exospório (PLOMP et al., 2005).

Esporos que são metabolicamente inativos podem permanecer sob a forma dormente por vários anos, entretanto, uma vez expostos às condições favoráveis como a presença de nutrientes e temperatura ótima, os mesmos são capazes de germinar e se tornarem células vegetativas novamente. A destruição ou prevenção da germinação de esporos é de extrema importância durante o processamento de alimentos, uma vez que esporos não germinados não causam deterioração ou transmissão de doenças através dos alimentos (RAY, 2003). A elevada resistência dos esporos contribui para a sobrevivência de *B. cereus* ao longo das etapas de processamento de produtos lácteos.

Diversos fatores são atribuídos à elevada resistência dos esporos, tais como a genética da bactéria formadora de esporo, temperatura de esporulação, conteúdo limitado de água presente no núcleo e na capa do esporo, dentre outros (LINDSAY; FLINT, 2009). A estrutura específica de esporos bacterianos é diferente da estrutura das células vegetativas, sendo que a capa do esporo, composta principalmente por camadas de proteínas, também tem sido associada à sua elevada resistência (RAY, 2003).

Além da sobrevivência por longos períodos, o fato dos esporos serem muito mais resistentes do que as células vegetativas pode também resultar na contaminação de superfícies que estão em contato com alimentos (RYU; BEUCHAT, 2005; KRESKE et al., 2006). Na literatura tem sido reportada que algumas cepas de *B. cereus* são capazes de aderir e formar biofilmes em plantas de processamento de leite e produtos lácteos (WIJMAN et al., 2007; SHI; ZHU, 2009; SALUSTIANO et al., 2010; MALEK, 2012; PEÑA et al., 2014).

Tanto células vegetativas como esporos são capazes de interagirem com o aço inoxidável e com compostos presentes em incrustações de leite (PARKAR et al., 2001; FLINT et al., 2001; SEALE et al., 2008). No entanto, os esporos aderem com mais facilidade

na superfície de aço inoxidável, devido principalmente às suas propriedades hidrofóbicas (RYU; BEUCHAT, 2005). Os esporos aderidos se tornam mais resistentes à higienização podendo recontaminar o alimento processado e, quando houver condições ambientais favoráveis, os esporos podem germinar convertendo-se em células vegetativas e, assim causarem deterioração ou transmitirem doenças por meio dos alimentos (ELHARIRY, 2011).

2.2 Adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos

A adesão de micro-organismos é um fenômeno que ocorre naturalmente quando qualquer célula microbiana entra em contato com uma superfície sólida. Este fato pode acarretar em diversas implicações sobre a qualidade microbiológica de um alimento e a consequente formação de biofilme fornece proteção às células contra a remoção por limpeza, aumentando assim sua resistência aos sanitizantes (RAY, 2003).

Bactérias em seu habitat natural podem existir em duas formas: livres ou associadas a uma superfície. As células livres são designadas planctônicas e as associadas a uma superfície em processo de adesão e formação de biofilmes são denominadas sésseis (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998).

As propriedades superficiais (tensão superficial, composição da superfície) das interfaces dos suportes de adesão (aço, polímero, mármore, entre outros) e dos micro-organismos desempenham papel importante na adesão dos micro-organismos a essas superfícies. Além do que, as propriedades microbiológicas e as características do meio circundante determinam em muitos sistemas o processo de adsorção (UBBINK; SCHÄR-ZAMMARETTI, 2007; ARAÚJO et al., 2010).

A definição de biofilmes é relatada por diversos autores, sendo que Schneider (2007) propôs sua diferenciação das células planctônicas, além de incluir todas as formas de vida microbiana com característica de biofilme. Desta forma, “biofilmes são comunidades de micro-organismos, aderidas a superfícies ou suspensas em solução, cujas células podem ou não estar envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes”.

Biofilme em ambientes de processamento de leite e produtos lácteos desenvolve-se inicialmente pelo acúmulo de matéria orgânica em uma superfície, a qual é colonizada por bactérias ou esporos. Durante o processamento de leite e produtos lácteos, as proteínas e

minerais presentes no leite podem formar depósitos nos trocadores de calor e evaporadores devido a elevada temperatura encontrada nessas regiões (BREMER et al., 2009).

De acordo com Seale et al. (2008), biofilmes de *Bacillus* sp. são formados principalmente quando esporos presentes em leite cru sobrevivem à pasteurização, aderem às superfícies de aço inoxidável e germinam sob condições adequadas. A partir do momento em que os biofilmes se tornam maduros pode ocorrer o desprendimento de células e esporos, contaminando os produtos durante o processamento (FLINT et al., 2001).

Biofilmes são caracterizados pelas condições do meio e pelas superfícies colonizadas, pelos genes de bactérias ativados e requeridos para formar e mantê-lo, e pelos tipos de produtos extracelulares que são concentrados na matriz do biofilme. Uma mesma bactéria pode formar diferentes tipos de biofilmes sob diversas condições ambientais, que podem ser constituídos por uma única camada ou estruturas tridimensionais (MARCHAND et al., 2012). A composição e a estrutura dos biofilmes dependem de uma ampla variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como espécie do micro-organismo, pH, presença de sais e nutrientes, meios de cultivo, temperatura do processo, condições de fluxo (MCLANDBOROUGH et al., 2006).

Seale et al. (2010) observaram que a adesão de esporos de *Geobacillus* sp foi dependente do pH, uma vez que em valores de pH próximo ao ponto isoelétrico tanto dos esporos como da superfície de aço inoxidável, o número de esporos aderidos aumentou, quando comparado às condições de pH neutro. A adesão de esporos ao aço inoxidável foi três vezes maior em pH 3 quando comparado ao pH 7.

O efeito da temperatura (48, 55 e 60 °C) foi avaliado na formação de biofilme de esporos de *Anoxybacillus flavithermus* utilizando um reator de fluxo contínuo de escala laboratorial. Os autores observaram a formação de biofilme com 10 a 50% de esporos de *A. flavithermus* a 55 e 60 °C. Entretanto, nenhum esporo foi detectado na temperatura de 48 °C. Os autores também demonstraram que tanto células vegetativas quanto esporos de *A. flavithermus* foram capazes de formar biofilme, sendo que a formação de esporos e do biofilme pareceu ser um evento que ocorre simultaneamente (BURGESS et al., 2009).

Existem diversas teorias em relação à adesão e formação de biofilmes. Segundo Wirtanen; Salo (2005), existem duas etapas bem definidas, no qual a primeira é denominada como reversível, pois nesta etapa o micro-organismo ainda está fracamente aderido à superfície por meio de forças de Van der Waals e interações eletrostáticas, e desta forma,

pode ser removido facilmente através da simples lavagem. A segunda é considerada como irreversível, pois nesta etapa ocorre a adesão física da célula à superfície por material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pelo micro-organismo, denominado de exopolissacarídeo (EPS). O EPS forma um complexo com o material da superfície e/ou ligações específicas de receptores localizados no pili, fímbrias e flagelos dos micro-organismos, através de interações como dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e covalentes, etc.

Entretanto, Bryers; Ratner (2004) sugerem que a formação de biofilmes envolve a sequência de etapas apresentadas na Figura 1.

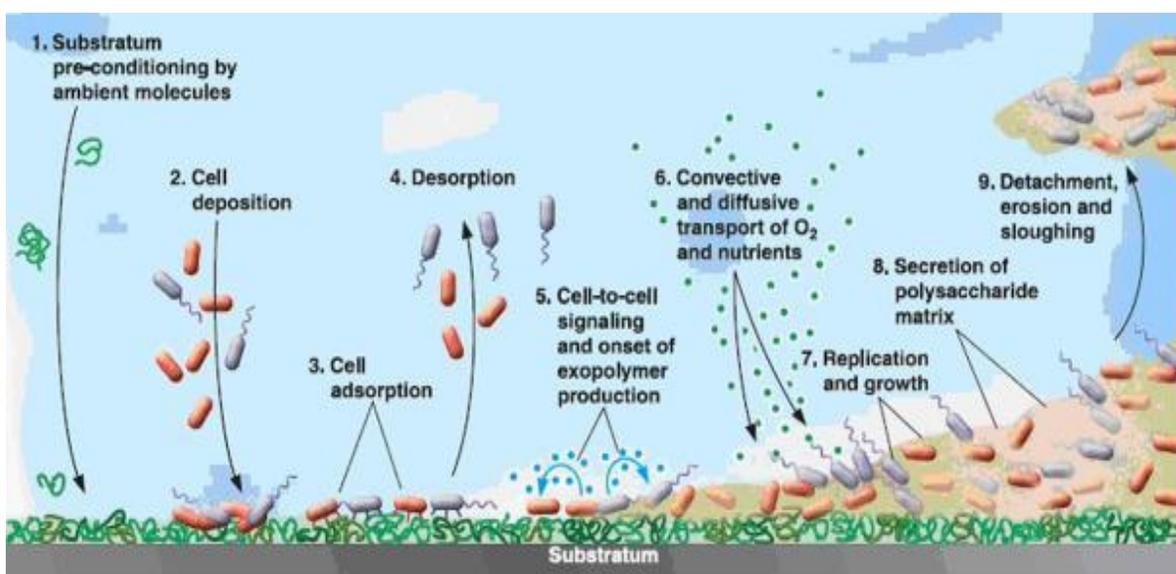


Figura 1. Etapas envolvidas na formação de biofilmes.

1) pré-condicionamento da superfície tanto por macromoléculas ou coberturas intencionais; 2) transporte de células planctônicas do fluido até a superfície; 3) adsorção de células; 4) desorção de células aderidas reversivelmente; 5) adsorção irreversível; 6) produção de moléculas sinalizadoras; 7) transporte de substratos para o interior do biofilme; 8) metabolismo do substrato pelas células aderidas ao biofilme e transporte de produtos para fora do biofilme, sendo acompanhados por desenvolvimento celular, replicação e produção de exopolissacarídeos; 9) remoção parcial do biofilme através do desprendimento das células ou erosão.

Fonte: (BRYERS; RATNER, 2004).

O primeiro evento que ocorre quando materiais entram em contato com o ambiente de processamento, é a formação de um filme condicionante, que na indústria de produtos

lábteos consiste principalmente dos componentes orgânicos e inorgânicos provenientes do leite, e que normalmente ocorre nos primeiros 5 a 10 segundos após limpeza ineficiente da superfície (MITTELMAN, 1998). Esse condicionamento também altera as propriedades físico-químicas da superfície, tais como variação na energia livre de Gibbs de interação hidrofóbica e variação na energia livre de Gibbs de adesão, que podem afetar a ordem dos eventos microbianos (DICKSON; KOOHMARAIE, 1989). Durante o segundo estágio de formação do biofilme, células únicas são transportadas para as superfícies e pontes reversíveis são formadas entre a interface celular e a interface do substrato.

A fixação de bactérias pode ser mediada por apêndices celulares como fímbrias, pili e flagelos, sendo que as substâncias poliméricas extracelulares (exopolissacarídeos) agem como uma ponte entre as bactérias e o filme condicionante (KOKARE et al., 2009). No entanto, a adesão de bactérias à superfície não está condicionada à produção de exopolissacarídeos, visto que a adesão e consequente formação de biofilme podem ocorrer mesmo na ausência destes (HOOD; ZOTTOLA, 1997). Apesar de não produzirem exopolissacarídeos, esporos podem formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos (ROSADO, 2009). A adesão de esporos de *B. cereus* é atribuída principalmente a três fatores, alta hidrofobicidade, baixa carga de superfície e presença de apêndices celulares (HUSMARK; RÖNNER, 1990; ANDERSSON; RONNER; GRANUM, 1995; LINDSAY; FLINT, 2009).

Acredita-se que diversos fatores estão envolvidos na adesão bacteriana em diferentes superfícies e interfaces, tais como hidrofobicidade, carga elétrica de superfície, temperatura, presença de substrato e aparatos celulares como fímbrias, pili e flagelos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; WILLIAMS; FLETCHER, 1996; LI et al., 2009). As características físico-químicas da superfície dos micro-organismos, tanto de células vegetativas quanto de esporos de *Bacillus* sp, têm sido investigadas por alguns autores (FAILLE et al., 2002; FAILLE et al., 2010a; PALMER et al., 2010; SEALE et al., 2010; ELHARIRY, 2011; HARIMAWAN et al., 2013).

A hidrofobicidade da superfície celular está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa dos micro-organismos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994), além do que, interações hidrofóbicas tendem a aumentar com o aumento da natureza não polar das superfícies envolvidas, sejam elas da célula e/ou do substrato, sendo assim, um fator importante na adesão (DONLAN, 2002).

A adesão de *B. cereus* às superfícies de contato é afetada pela interação das características físico-químicas da superfície do micro-organismo e da superfície de contato (BERNARDES et al., 2010). De acordo com Drenkard; Ausubel (2002), além das bactérias aderirem às superfícies, as interações hidrofóbicas também podem contribuir para a adesão entre elas. A combinação dos parâmetros de hidrofobicidade e carga elétrica de superfície da bactéria normalmente fornece indicações com relação a adesão não específica das células às superfícies (UBBINK; SCHÄR-ZAMMARETTI, 2007).

A habilidade de esporos de *Bacillus* sp. em aderir às superfícies de seis diferentes materiais incluindo aço inoxidável foi avaliada por Faille et al. (2002). Os autores observaram que esporos de *B. cereus* com natureza mais hidrofóbica apresentaram maior adesão quando comparados aos esporos de *Bacillus subtilis* em superfícies do mesmo material, sugerindo que interações hidrofóbicas possuem influência na adesão de micro-organismos.

A presença de apêndices extracelulares (flagelos, pilli, fímbria), que podem variar em tamanho e rigidez, também pode favorecer a adesão de micro-organismos às superfícies (DONLAN, 2002; ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008a). Normalmente esses apêndices estão carregados positivamente, assim são capazes de sobrepor a repulsão eletrostática que pode existir entre o substrato e a bactéria (PALMER et al., 2010).

Além disso, a forte adesão de *B. cereus* tem sido atribuída ao caráter hidrofóbico do exospório. Um estudo conduzido por Faille et al (2007), demonstrou que esporos de *B. cereus* sem a presença do exospório ou com o mesmo danificado, apresentaram significativamente menor adesão quando comparados a esporos com o exospório intacto.

Informações relacionadas às características da adesão de esporos bacterianos em diversos tipos de superfícies de contato com alimentos são importantes, uma vez que deve-se evitar a adesão ou inativar os esporos por meio do processo de higienização (NANASAKI et al., 2010).

Estudos propõem que durante a formação de um biofilme, células bacterianas podem modificar a superfície a ser colonizada em resposta às condições do meio em que se encontram, ou seja, elas podem adotar medidas adaptativas, criando microambientes durante o desenvolvimento microbiano sobre uma superfície, resultando na formação de comunidades complexas e fenotipicamente heterogêneas (KLAUSEN et al., 2006; MONDS; O'TOOLE, 2009). Em ambientes onde há limitação de nutrientes e fluxo turbulento, biofilmes são considerados como mecanismo de sobrevivência, proteção e propagação de

bactérias, uma vez que essas condições são consideradas adversas à sobrevivência do micro-organismo (DAVEY; GEORGE; TOOLE, 2000).

Os biofilmes por serem constituídos de agregados de células, se tornam um ambiente propício para a comunicação célula-célula, denominado *quorum sensing*. Esta comunicação pode desempenhar um papel tanto na ligação de células quanto no desprendimento de biofilmes (BASSLER, 2002; DONLAN, 2002). O processo de *quorum sensing* fornece um importante mecanismo para auto-organização e regulação de células microbianas (Parsek; Greenberg, 2005), uma vez que envolve um sistema sinalizador (moléculas sinalizadoras ou autoindutoras (AI)) que permite a bactéria monitorar e responder sinais de acordo com a sua própria densidade populacional.

Após a etapa de adesão e formação de biofilme, ocorre comumente a contaminação do produto final durante o processo como consequência do desprendimento de células individuais ou liberação de fragmentos do biofilme (SVENSSON et al., 2000; SCOTT et al., 2007; BURGESS et al., 2009; SALUSTIANO et al., 2010). Flint et al. (2001) relataram que esse mecanismo é conhecido como potencial de biotransferência, uma vez que observaram a liberação e o desprendimento de células vegetativas e esporos de *Geobacillus stearothermophilus* em fluxo de leite após a formação de biofilme em aço inoxidável.

A permanência em biofilmes confere proteção às células vegetativas e esporos principalmente no que se refere a resistência à limpeza, sanitizantes, antibióticos, radiação UV e desidratação (ELASRI; MILLER, 1999; RYU; BEUCHAT, 2005; LEBERT; LEROY; TALON, 2007). Além do prejuízo à qualidade e segurança microbiológica do produto (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2004), a formação de biofilmes pode causar perda de energia nos trocadores de calor, redução do fluxo de alimentos devido a obstruções de equipamentos, aceleração da corrosão do aço inoxidável devido aos metabólitos bacterianos e deterioração de sensores, detectores e equipamentos (WIRTANEN et al., 1996; PARKAR; FLINT; BROOKS, 2004).

Os requerimentos esperados de materiais que entram em contato com alimentos fazem com que o aço inoxidável seja amplamente empregado na indústria láctea, uma vez que é química, bacteriológica e sensorialmente neutro em relação ao alimento. Além disso, apresenta facilidade de higienização e durabilidade, principalmente em relação à corrosão e ao envelhecimento. Outros fatores que estão relacionados à preferência da indústria láctea por aço inoxidável são as características mecânicas, coeficiente de expansão, condutividade

térmica e facilidade de utilização (BREMER et al., 2009). No entanto, o aço inoxidável pode apresentar fissuras ou fendas com tamanho suficiente para alojar micro-organismos. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização e favorecer a adesão de micro-organismos com consequente formação de biofilmes (BOWER; MCGUIRE; DAESCHEL, 1996).

Nas indústrias lácteas, acredita-se que o leite cru é a principal fonte para a entrada de *B. cereus* no processamento desses produtos (PEÑA et al., 2014) e as superfícies de equipamento pós pasteurização são reconhecidas como a principal causa de recontaminação de leite e produtos lácteos uma vez que podem favorecer a adesão e formação de biofilmes por micro-organismos (SVENSSON et al., 1999; BROOKS; FLINT, 2008; SALUSTIANO et al., 2010).

Biofilmes presentes em indústrias lácteas são difíceis de remover principalmente devido à presença de resíduos de proteínas e minerais (fosfato de cálcio), além das dificuldades associadas ao processo de higienização dos equipamentos e ambientes de processamento (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006). Marchand et al (2012) relatam que para cada célula planctônica detectada pode existir em torno de 1000 organismos presentes em biofilmes.

2.3 Controle da formação de biofilmes e influência das etapas de higienização

A higienização dos equipamentos de processamento de alimentos é de extrema importância para o controle da contaminação microbiológica dos produtos, entretanto, esse processo se torna cada vez mais difícil devido a elevada resistência das células aderidas aos sanitizantes e a outros agentes antimicrobianos (BLOOMFIELD; ARTHUR, 1993; MAH; O'TOOLE, 2001; BRIDIER et al., 2011). A eficiência dos produtos disponíveis no mercado é baseada em testes realizados com células planctônicas, que podem ser fisiologicamente diferentes das células presentes em biofilmes, o que pode implicar na menor eficiência dos produtos na remoção de biofilmes (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

O controle ineficiente de biofilmes por meio de métodos tradicionais de limpeza e sanitização nas indústrias de alimentos tem sido associado com a resistência dos micro-organismos. As bactérias submetidas à ação de agentes sanitizantes têm demonstrado alta resposta adaptativa ao meio em que se encontram, apresentando elevada resistência (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2009). Kim et al. (2009), acreditam que a presença de células

dormentes nos biofilmes é a principal razão para essa elevada resistência antimicrobiana. Micro-organismos patogênicos, tanto na forma vegetativa quanto na forma de esporo, aderidos em superfícies de contato com alimentos, apresentam um risco potencial devido à contaminação cruzada, sendo que a higienização adequada dessas superfícies é importante para prevenir este tipo de contaminação (LEE et al., 2010).

A forma mais direta para prevenir a contaminação e a consequente deterioração do produto processado é evitar a formação do biofilme por meio da higienização constante da planta de processamento em curtos intervalos de tempo, além do monitoramento do procedimento. Entretanto, isso nem sempre é possível e algumas vezes não é suficiente. Em geral, *Bacillus* sp. são difíceis de serem eliminados devido à alta taxa de desenvolvimento, resistência dos esporos ao calor, a agentes químicos e habilidade em formar biofilmes (FLINT et al., 2001; PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003).

Para as indústrias lácteas, a presença da forma esporulada é o fator mais preocupante (SCOTT et al., 2007; BURGESS et al., 2009), uma vez que possuem capacidade de sobreviver em condições adversas tais como, elevadas temperaturas utilizadas no processamento de produtos (pasteurização, secagem, esterilização), limpeza CIP (do inglês, *cleaning in place*), armazenamento prolongado do produto final e baixa atividade de água. Segundo Malek (2012), o processo de pasteurização parece ser um passo chave com relação às bactérias formadoras de esporos, uma vez que as temperaturas utilizadas desempenham um papel crucial na ativação dos esporos. Por outro lado, a sobrevivência de células vegetativas é menos susceptível quando encontram as mesmas condições de processamento e armazenamento do produto (SCOTT et al., 2007; NANASAKI et al., 2010).

A utilização do sistema CIP é a principal forma de controlar a formação de biofilmes nas plantas de processamento de leite e produtos lácteos. Nesse processo é possível a higienização completa dos itens de uma planta assim como das tubulações sem a necessidade de desmontar ou abrir o equipamento e com pouco ou nenhum manuseio. Na indústria láctea, o processo CIP envolve a etapa de limpeza com hidróxido de sódio e ácido nítrico, além de etapas de pré-enxague e enxague com água. Em alguns casos, agentes sanitizantes também são incorporados no sistema CIP (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

Os produtos químicos normalmente usados para a limpeza são tensoativos ou produtos alcalinos, com o objetivo de suspender e dissolver resíduos de alimentos, através da diminuição da tensão superficial, emulsão de gorduras e desnaturação de proteínas

(SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Os agentes ácidos, tais como ácido nítrico, atuam na remoção de resíduos inorgânicos como minerais que são responsáveis por incrustações, como as conhecidas “pedras de leite”, nas superfícies do aço inoxidável. As soluções sanitizantes visam à eliminação dos micro-organismos patogênicos e a redução dos deteriorantes a níveis seguros (SALUSTIANO et al., 2010).

Após a higienização, qualquer bactéria remanescente ou resíduo de esporo pode continuar sua proliferação podendo causar problemas no processamento de alimentos, ou mesmo o restabelecimento de um novo biofilme (VERRAN, 2002; PARKAR; FLINT; BROOKS, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que biofilmes presentes na indústria láctea, constituídos de bacilos Gram positivos formadores de esporos e estreptococos termorresistentes não são removidos adequadamente por um procedimento de limpeza CIP padrão (BORE; LANGSRUD, 2005; BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; BROOKS; FLINT, 2008). No entanto, a adição de aditivos ao detergente alcalino, como agentes sequestrantes, quelantes e tensoativos e uma mistura de ácido nítrico (contendo surfactantes), resultou na redução de 3,8 ciclos logarítmicos no número de células presentes em superfície de aço inoxidável. Neste caso, a utilização de um agente sanitizante após a limpeza não aumentou a eficiência do procedimento (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

Alguns autores demonstraram que esporos de *B. cereus* aderidos em aço inoxidável são mais difíceis de remover através da utilização de procedimentos CIP do que células vegetativas da mesma bactéria (FAILLE; FONTAINE; BÉNÉZECH, 2001; PENG; TSAI; CHOU, 2002). Esporos de *B. cereus* isolados de tanques de silo de laticínios apresentaram elevada resistência à limpeza alcalina (1% NaOH, 15min, 75 °C) e foram ainda capazes de germinar e formar biofilme em leite integral (SHAHEEN et al., 2010).

Além dos esporos apresentarem resistência a ambientes com condições adversas, os biofilmes podem protegê-los, e desta forma, uma dupla resistência pode ser conferida aos esporos. Os procedimentos de higienização devem atingir os esporos dentro dos biofilmes e, sendo assim, os agentes sanitizantes, além da atividade contra biofilmes, devem ser selecionados pelo efeito esporicida (MALEK, 2012). A capa do esporo apresenta uma estrutura rígida que contém elevado conteúdo do aminoácido cistina, que não é susceptível à oxidação, dificultando assim a ação de agentes químicos (MORAES et al., 1997).

O controle de *B. cereus* nas indústrias lácteas deve enfatizar quais os procedimentos adequados de limpeza e sanitização, tais como o controle de pH e concentrações dos reagentes, tempo e temperatura de exposição das soluções, para desta forma obter a efetiva remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos, bem como de micro-organismos (SALUSTIANO et al., 2010).

Em condições reais de processamento, quando a higienização é considerada ineficiente, uma camada de biofilme ainda pode permanecer na superfície, facilitando, uma nova propagação de um biofilme com maior resistência do que o formado anteriormente (LEMOS et al., 2015). A presença de bactérias em superfícies de linhas de processamento tem sido também reportada devido ao fenômeno de readesão, mesmo após procedimentos de higienização (LE GENTIL; SYLLA; FAILLE, 2010). Sabe-se que os equipamentos utilizados em linhas de processamento de leite e produtos lácteos são expostos a uma ampla faixa de temperatura e que procedimentos incorretos ou ineficientes de higienização dos equipamentos podem fornecer substratos para a formação de biofilmes de *B. cereus* (PEÑA et al., 2014).

A etapa de sanitização finaliza o procedimento de higienização em um sistema CIP completo e irá assegurar a qualidade microbiológica das superfícies. Informações relacionadas às formas de uso, concentrações recomendadas e modo de ação são importantes na escolha do sanitizante mais adequado para determinado processamento (TROLLER, 1993), uma vez que a utilização inadequada dos sanitizantes pode promover a seleção de bactérias altamente resistentes (GRAM et al., 2007).

A ação dos sanitizantes pode ser afetada pela concentração, pH, tempo e temperatura de contato, tipos de resíduos presentes nas superfícies, meios de cultivo, concentração de micro-organismos, entre outros fatores. Os sanitizantes químicos mais utilizados durante o processamento de alimentos são ácido peracético, cloraminas orgânicas, clorexidina, compostos de amônia quaternária, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, iodóforos e peróxido de hidrogênio (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b).

2.3.1 Ácido Peracético

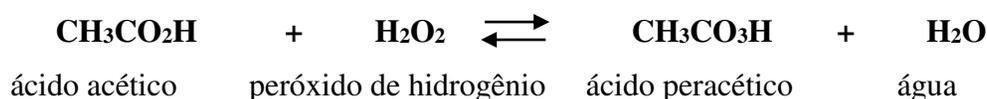
O ácido peracético é um sanitizante fortemente oxidante, de amplo espectro de atividade antimicrobiana, e por isso é utilizado em diversas indústrias, principalmente as de processamento de alimentos (ALASRI et al., 1992; FINNEGAN et al., 2010).

Possui excelente ação sanitizante contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e esporos (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b), sendo mais eficiente em ordem de grandeza contra bactérias, vírus, esporos bacterianos e cistos de protozoários (WESSELS; INGMER, 2013).

O mecanismo exato de ação pelo qual o ácido peracético oxida e elimina um micro-organismo ainda é controverso devido à complexidade de suas vias de reação (ROKHINA et al., 2010). Acredita-se que esse agente inibe ou elimina os micro-organismos por diversos mecanismos, uma vez que diversos radicais livres, que são altamente reativos, surgem das reações do peróxido com compostos orgânicos. O ácido peracético é um agente oxidante não específico, que reage em locais ricos em elétrons, na di-hidroxilação de ligações duplas C-C e na formação de radicais livres, o que significa que a célula microbiana será altamente danificada após o contato com a molécula de ácido peracético (WESSELS; INGMER, 2013).

A ação do ácido peracético pode ser reduzida se a célula microbiana se encontrar presente em biofilmes, uma vez que os componentes do biofilme podem dificultar o alcance do sanitizante na superfície celular. Sendo assim, a etapa de limpeza para remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos é extremamente importante antes da aplicação dos agentes sanitizantes (BRIDIER et al., 2011).

O ácido peracético é disponível comercialmente na forma de uma mistura em equilíbrio de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e água, conforme apresentado na Equação 1 (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b):



Equação 1. Reação de formação do ácido peracético

Essa mistura tem um odor forte e baixo pH, normalmente 2,8, sendo normalmente produzida em concentrações entre 5 e 15% (SREY; JAHID; HA, 2013). O ácido peracético possui ação em baixas temperaturas e não é afetado pela dureza da água, no entanto, possui baixa estabilidade ao armazenamento, é incompatível com ferro, cobre e alumínio, necessita de manuseio especializado uma vez que pode ser irritante à pele e mucosas e o composto concentrado possui odor de vinagre (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b).

Alguns estudos relatam que o ácido peracético foi mais eficiente na remoção de biofilmes quando comparado a outros sanitizantes (HOLAH et al., 1990; ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998; FATEMI; FRANK, 1999; IBUSQUIZA; HERRERA; CABO, 2011; BELTRAME et al., 2012).

A utilização de ácido peracético na concentração de 0,2% por 2 min à 10 °C foi mais eficiente quando comparado a clorexidina, quaternário de amônia e ácidos orgânicos na redução das contagens de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (BELTRAME et al., 2012).

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

Este sanitizante, na concentração de 120 mg/L por 2 min também foi considerado efetivo por Andrade; Bridgeman; Zottola (1998), na redução da contagem (4,8 ciclos log) de biofilme de *Enterococcus faecium* isolado de leite cru, em aço inoxidável.

Entretanto, a aplicação de ácido peracético na concentração de 0,5% por 10 min foi ineficiente na remoção de todos os biofilmes formados por *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis*, *Pseudomonas putida*, *Listeria innocua* em aço inoxidável contendo caldo TSB (KRÓLASIK et al., 2010).

2.3.2 Hipoclorito de sódio

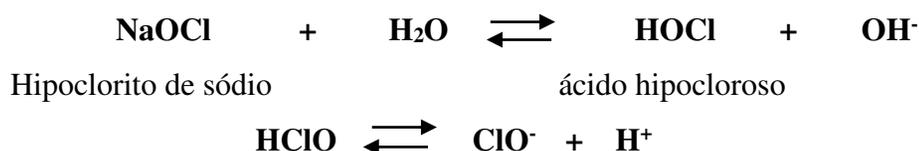
O cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, é o composto mais utilizado para garantir a qualidade e aumentar a segurança microbiológica de alimentos processados (NASCIMENTO et al., 2005). O hipoclorito é comercializado sob a forma líquida, com concentrações variando de 2 a 10% de cloro residual total, expresso em Cl₂. Apresenta diversas vantagens como rápida ação, não é afetado pela dureza da água, efetivos em baixas concentrações, relativamente não tóxicos nas condições de uso, de fácil aplicação e baixo custo (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b).

A ação bactericida do cloro, está vinculada ao ácido hipocloroso, um ácido fraco que em valores de pH inferiores a 6,0 está predominantemente na forma não dissociada. O ácido hipocloroso possui a capacidade de penetrar através da membrana celular, oxidar os grupos sulfidrilas de certas enzimas que participam da via glicolítica, e, desta forma, eliminar a célula (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b).

Possui amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, vírus, esporos, além do fato de ser um produto relativamente barato (EMMANUEL et al., 2004). Young; Setlow (2003) sugeriram que o mecanismo esporicida do cloro está relacionado ao dano causado na membrana interna, resultando em mudança de permeabilidade da membrana plasmática do esporo germinado. Esporos de *B. subtilis* tratados com cloro iniciaram a germinação mas não foram capazes de crescer devido ao dano causado na membrana.

No entanto, o hipoclorito de sódio pode ser inativado pela matéria orgânica, ser corrosivo à superfície do aço inoxidável, dependendo da concentração pode causar irritação a pele, apresentar menor eficiência em pH elevado, instável ao armazenamento e causar oxidação em borrachas utilizadas nos equipamentos, além da formação dos trihalometanos que são compostos cancerígenos (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b).

O hipoclorito de sódio, quando em solução aquosa, libera o ácido hipocloroso em sua forma não dissociada, sendo este o principal responsável pela ação antimicrobiana do sanitizante, conforme apresentado na Equação 2. O pH possui um papel determinante nessa reação, uma vez que este é responsável pela quantidade de ácido hipocloroso em solução (TROLLER, 1993).



Equação 2. Reação de dissociação do hipoclorito de sódio em solução aquosa.

Alguns autores demonstraram a eficiência do hipoclorito de sódio na remoção de biofilmes (SPRATT et al., 2001; GIARDINO et al., 2007; TOTÉ et al., 2010).

A utilização de hipoclorito de sódio após uma limpeza completa resultou na presença de menos que 0,85 UFC/cm² de *B. cereus* que estava presente em biofilme em aço inoxidável (SALUSTIANO et al., 2009).

Joseph et al. (2001) relataram que o tratamento com hipoclorito de sódio à 100 ppm por 15 min eliminou o biofilme de *Salmonella* presente em aço inoxidável.

Hipoclorito de sódio na concentração de 100 mg/L por 10 min foi mais eficiente quando comparado ao ácido peracético na remoção de biofilmes de *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *S. aureus* em aço inoxidável (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Gândara; Oliveira (2000) observaram que os melhores resultados na remoção de biofilme em aço inoxidável, formado por *Streptococcus thermophilus* isolado de leite pasteurizado, foram obtidos a partir da utilização de hipoclorito de sódio após as etapas de limpeza alcalina e ácida.

Cabeça; Pizzolitto; Pizzolito (2006), avaliaram a ação de vários sanitizantes utilizados na indústria de alimentos, em relação a biofilme de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, e observaram que o hipoclorito de sódio, na concentração de 150 mg/L, foi o mais efetivo, promovendo reduções de 5,5 e 6,5 log UFC/cm², após 28 e 48 h, respectivamente.

Considerando a complexidade da estrutura do biofilme e a dificuldade de sua remoção utilizando-se os processos usuais de limpeza da indústria láctea, o entendimento do efeito das matrizes lácteas na adesão de células vegetativas e esporos de *B. cereus* ao aço inoxidável pode favorecer o desenvolvimento de sistemas de limpeza adequados para controlar a formação de biofilmes desse micro-organismo nas plantas de processamento de leite e produtos lácteos, garantindo, assim, a qualidade e segurança microbiológica dos produtos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em quatro etapas sequenciais, cada uma delas constituída de triplicata de experimentos que foram independentemente avaliados através de delineamento experimental e análise estatística adequada dos dados. As duas primeiras etapas tiveram como objetivo selecionar situações de maior adesão e formação de biofilme por células vegetativas ou esporos de *B. cereus* em aço inoxidável. Estabelecidas as condições de maior adesão, a terceira etapa do trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tempo de exposição na adesão e formação de biofilme em aço inoxidável por esporos de *B. cereus*. Finalmente, a quarta etapa do trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência dos procedimentos de limpeza e sanitização na remoção de biofilmes formados por esporos de *B. cereus* estabelecidos nas melhores condições de matriz e tempo de exposição para adesão e formação de biofilme.

As duas primeiras etapas foram realizadas com os mesmos isolados de *B. cereus*, incluindo uma cepa ATCC (sequenciada de referência *American Type Culture Collection*), na forma de células vegetativas ou esporos, utilizando-se a mesma superfície de aço inoxidável devidamente preparada. Para as demais etapas, foram utilizados apenas esporos dos isolados de *B. cereus*. Desta forma, antes do detalhamento dos experimentos serão apresentados: a origem dos isolados de *B. cereus*; a metodologia de preparo das células vegetativas e da suspensão de esporos; e a caracterização e o preparo da superfície de aço inoxidável.

3.1 Origem dos isolados

Foram utilizadas quatro cepas de *B. cereus*, isoladas previamente do ambiente de processamento de ricota por Fernandes et al. (2014), mantidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, BHI, Difco, Sparks, MD, USA) adicionado de glicerol a -80 °C. As cepas codificadas como 164, 167, 174 e 176 apresentaram genes relacionados às enterotoxinas HBL e NHE, responsáveis pela síndrome diarreica, e resistência a diferentes antibióticos, conforme apresentado na Tabela 2. Foi utilizado um *pool* dessas cepas na avaliação da adesão e formação de biofilme em aço inoxidável. A cepa de *B. cereus* ATCC 14579, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação (FEA/UNICAMP) também foi selecionada para estudo nas etapas iniciais.

Tabela 2. Características das culturas isoladas do processamento de ricota e utilizadas na formação do biofilme de *B. cereus*.

Espécie (n° da cepa)	Local de isolamento	Genes de virulência	Resistência a antibióticos
<i>B. cereus</i> (164)	Bancada de embalagem	<i>hblA, hblC, hblD, nheA, nheB, nheC</i>	Ampicilina, Penicilina e Trimetoprim
<i>B. cereus</i> (167)	Caixa de armazenamento	<i>hblC, hblD, nheA, nheB, nheC</i>	Ampicilina, Penicilina e Trimetoprim
<i>B. cereus</i> (174)	Ralo de escoamento do soro	<i>hblA, hblC, hblD, nheA, nheB, nheC</i>	Ampicilina, Penicilina e Trimetoprim
<i>B. cereus</i> (176)	Forma	<i>hblA, hblC, hblD, nheA, nheB, nheC</i>	Ampicilina, Penicilina e Trimetoprim

Fonte: Adaptado de Fernandes et al. (2014).

3.2 Preparo das células vegetativas

Para a obtenção da suspensão de células vegetativas de *B. cereus*, as cepas (quatro isolados da indústria láctea e uma ATCC 14579) foram descongeladas e ativadas separadamente em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*, TSB, Difco, Sparks, MD, USA), a 35 ± 1 °C por 24 horas, de acordo com metodologia adaptada de Pagedar; Singh (2012). Após o crescimento, as células foram transferidas para tubos de centrífuga de polipropileno, com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados e submetidas à centrifugação (Centrífuga Beckman J2-21, Beckman Instruments, Palo Alto, Ca, EUA) a 4000 rpm por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante de cada cultura foi descartado e o concentrado de células foi ressuspensão em água peptonada 0,1% (p/v) para a lavagem das células, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após a lavagem das células, os quatro isolados da indústria foram ressuspensos em água peptonada 0,1% (p/v) e colocados em um mesmo tubo de centrífuga, a fim de obter uma suspensão de um *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção de uma suspensão da cepa de *B. cereus* ATCC 14579. As suspensões obtidas do *pool* de *B. cereus* e da cepa ATCC 14579

foram utilizadas subsequentemente na avaliação da adesão e formação de biofilme em aço inoxidável. O procedimento de preparo das suspensões de células vegetativas foi realizado antes de cada experimento e a contagem para controle da quantidade de células nas suspensões foi realizada por meio de plaqueamento em profundidade em placas de Petri utilizando-se ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*, TSA, Difco, Sparks, MD, USA) e as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 a 48 horas (LEE et al., 2010).

3.3 Preparo da suspensão de esporos

Os esporos de *B. cereus* foram produzidos de acordo com metodologia descrita por Samapundo et al. (2014), com modificações. As cepas (quatro isolados da indústria láctea e uma ATCC 14579) foram ativadas em caldo TSB, a 35 ± 1 °C por 24 horas e, após este período, foram submetidas à um tratamento térmico em banho-maria a 80 ± 1 °C por 12 minutos e, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos. As culturas foram estriadas para isolamento em placas com ágar para esporulação AK (Arret e Kirshbaum) agar # 2 (Formulação em g/L: digesto pancreático de gelatina: 6,0 g; digesto pancreático de caseína: 4,0 g; extrato de levedura: 3,0 g; extrato de carne: 1,5 g; glicose: 1,0 g; ágar: 15,0 g; sulfato de manganês: 0,3 g). As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C e após 24 horas uma colônia representativa foi inoculada em tubos contendo caldo TSB, que foram incubados durante uma noite (10 a 12 horas) a 35 ± 1 °C. Cada cepa foi estriada individualmente em quadruplicata para crescimento em placas com ágar para esporulação AK agar # 2 e incubadas a 35 ± 1 °C.

As placas foram observadas após 7 a 10 dias de incubação para avaliar a extensão da esporulação utilizando microscopia de contraste de fase e/ou coloração de esporos com verde malaquita. Uma vez observada a esporulação, as placas foram incubadas durante uma noite (10 a 12 horas) a 4 ± 1 °C para induzir maior produção de esporos, visando alcançar 90 a 95% de esporulação.

Os esporos obtidos foram coletados das placas de Petri por meio de adição de água peptonada 0,1% (p/v) e raspagem da superfície do ágar com auxílio de alça de Drigalski. Os esporos de cada cepa (provenientes de quatro placas) foram coletados em tubos de centrífuga de polipropileno com tampas rosqueáveis previamente esterilizados e submetidos à centrifugação (Centrífuga Beckman J2-21, Beckman Instruments, Palo Alto, Ca, EUA) a 4000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante de cada cultura foi descartado, o concentrado de esporos foi ressuspenso em aproximadamente 25 mL de água peptonada 0,1%

(p/v), e submetido a um tratamento térmico de 70 °C por 30 minutos. Após o tratamento térmico, o concentrado foi centrifugado novamente nas condições descritas anteriormente e 10 mL de solução de lisozima esterilizada a frio (1 mg/mL de lisozima) foi adicionada em cada tubo de centrífuga à fim de digerir as células vegetativas remanescentes. Os tubos foram agitados em vórtex na velocidade máxima, incubados por 1 hora a 37 °C e centrifugados (4000 rpm por 20 minutos a 4 °C).

Em seguida, adicionou-se água Ultra Pura estéril em cada tubo e as amostras foram centrifugadas novamente, sendo este procedimento repetido três vezes. Os esporos foram ressuspensos em 30 mL de água Ultra Pura estéril gelada e armazenados a 4 °C. Desta forma, foram obtidas suspensões de esporos da cepa ATCC 14579 e de cada cepa de *B. cereus* isolado da indústria láctea. A contagem dos esporos foi realizada por meio de plaqueamento em profundidade em ágar TSA suplementado com 0,2% (p/v) de amido solúvel, e as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 a 48 horas (RUECKERT; RONIMUS; MORGAN, 2005).

Para a avaliação da adesão e formação de biofilme em aço inoxidável, no momento da análise, as suspensões dos esporos foram retiradas da geladeira e 1 mL de cada suspensão das cepas de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea foi adicionado em um mesmo tubo de ensaio estéril. Desta forma, a mistura dos quatro isolados (*pool*) foi serialmente diluída até atingir uma concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL nos meios de cultivo utilizados nos experimentos. A suspensão de esporos da cepa ATCC 14579 foi serialmente diluída até que também atingisse a concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL nos meios de cultivo utilizados nos experimentos.

3.4 Caracterização e preparo da superfície de aço inoxidável

Para avaliar a adesão e formação de biofilmes por *B. cereus*, chapas de aço inoxidável AISI 304 (*American Iron and Steel Institute*) acabamento número 4, com dimensões de 1,0 m x 1,2 m x 0,1 cm (Açomedi Aços Ltda, Barueri, SP, Brasil) foram cortadas em cupons de 1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm, que foram perfurados em um dos vértices (1 mm de diâmetro). A rugosidade do material foi realizada pelo Centro de Tecnologia da Unicamp, Laboratório de Metrologia, utilizando-se um rugosímetro (modelo S8P, Perthen, Mahr, Alemanha). O resultado obtido a partir de uma média de nove medições à temperatura de 20 ± 1 °C foi de 0,366 µm (ROSADO, 2009).

Para manter os cupons suspensos e imersos nos meios de cultivo durante os experimentos, foram utilizados fios de poliamida (Nylon®), de 0,2 mm de diâmetro. Antes de cada experimento, os cupons foram submetidos aos procedimentos de limpeza, utilizando-se metodologias adaptadas de Rosmaninho et al. (2007) e Palmer et al. (2010), à fim de simular um procedimento de limpeza CIP. Primeiramente, os cupons foram limpos com auxílio de esponja de poliuretano, água destilada e detergente líquido neutro, e secos naturalmente expostos ao ar ambiente. Em seguida, o fio de poliamida foi colocado no orifício dos cupons que foram imersos em um recipiente de aço inoxidável contendo água destilada à temperatura ambiente por 5 minutos sob agitação a 400 rpm (IKA Agitador Magnético com aquecimento RH Digital KT/C IKAMAG®, Staufen, Alemanha). Após essa etapa, os cupons foram imersos em um recipiente de aço inoxidável contendo solução de NaOH 1% (p/v) a 70 °C por 15 minutos a 400 rpm e imersos novamente em água destilada à temperatura ambiente por 5 minutos a 400 rpm. Na etapa de limpeza ácida, os cupons foram imersos em um recipiente de aço inoxidável contendo uma solução de ácido nítrico 1% (v/v) a 70 °C por 15 minutos a 400 rpm. Após esse procedimento, os cupons foram imersos em água destilada à temperatura ambiente por 5 minutos a 400 rpm, secos e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

3.5 Material e descrição das etapas do trabalho

3.5.1 Material

Para a realização dos experimentos, foram utilizados os materiais mencionados anteriormente nos itens 3.2, 3.3 e 3.4 (suspensões de células vegetativas e de esporos de *B. cereus*, cupons de aço inoxidável devidamente preparados), além de matrizes que foram utilizadas tanto para o condicionamento da superfície de aço inoxidável como meios de cultivo para a inoculação das suspensões de células vegetativas e esporos. Água Ultra Pura estéril foi utilizada como matriz controle e as matrizes lácteas utilizadas foram o leite UHT (do inglês, *Ultra High Temperature*) desnatado e integral (Shefa LTDA, Amparo, SP, Brasil).

Os leites UHT desnatado e integral foram adquiridos no mercado local, de um único lote em quantidade suficiente para todos os experimentos. Antes da utilização, os leites foram avaliados quanto às características microbiológicas e físico-químicas.

Com relação às características microbiológicas, realizou-se a contagem de mesófilos aeróbios, em ágar para contagem padrão PCA (*Plate Count Agar*, PCA - Difco, Sparks, MD, USA) com incubação a 32 ± 1 °C por 48 horas (LAIRD et al., 2004). Para a avaliação da presença de esporos, o leite foi submetido à um tratamento térmico de 80 ± 1 °C por 12 minutos, seguido de plaqueamento em PCA adicionado de 0,2% (p/v) de amido solúvel e incubação a 32 ± 1 °C por 48 horas (FRANK; YOUSEF, 2004). Não foram observadas contagens de mesófilos aeróbios e nem contagem de esporos para ambos os leites UHT desnatado e integral, sendo assim, os mesmos foram utilizados como matrizes lácteas na avaliação da adesão e formação de biofilme por *B. cereus*.

No que diz respeito às características físico-químicas, os leites foram avaliados quanto ao pH, acidez titulável, teor de gordura, nitrogênio total e extrato seco total, de acordo com metodologias oficiais (AOAC, 2006). Os leites atenderam aos requisitos determinados pela Portaria N° 146, Anexo XI, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (BRASIL, 1996), sendo que o leite UHT desnatado apresentou pH 6,80; 0,15% de ácido láctico; 0,44% de gordura; 3,41% de proteína e 9,48% de sólidos totais e, o leite UHT integral apresentou pH 6,79; 0,15% de ácido láctico; 3,23% de gordura; 3,00% de proteína e 11,82% de sólidos totais.

3.5.2 Adesão de *B. cereus* em aço inoxidável pré-condicionado com diferentes matrizes

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar o efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes, o efeito do tipo de inóculo, bem como da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilmes por células vegetativas e esporos de *B. cereus*. O esquema geral do experimento é apresentado na Figura 2. Inicialmente, os cupons devidamente preparados (seção 3.4) foram imersos assepticamente em frascos coletores universais estéreis, cada um contendo 60 mL de três diferentes matrizes para o condicionamento (água, leite UHT desnatado e leite UHT integral), de modo que os cupons não tocassem as bordas dos frascos. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 55 °C por 20 horas (LabLine Orbit Environ – Shaker 3527, LabLine Instruments, Melrose Park, IL, EUA).

A exposição dos cupons de aço inoxidável às diferentes matrizes teve por objetivo simular o processo na indústria láctea, uma vez que o contato com produtos de diferentes composições pode formar uma camada condicionante que afeta posteriormente a adesão do micro-organismo (DAT et al., 2014). As condições de temperatura (55 °C) e tempo de exposição (20 horas) utilizadas no experimento para avaliação da adesão e formação de biofilme por *B. cereus* foram estabelecidas visando simular as condições encontradas no processamento de produtos lácteos, que são, segundo (RÜCKERT; RONIMUS; MORGAN, 2004), temperaturas variando entre 6 a 65 °C nas seções de regeneração de trocadores de calor e 45 a 75 °C em evaporadores além do tempo de processamento de 16 a 20 horas antes de um procedimento padrão de higienização CIP.

Após 20 horas, os cupons de aço inoxidável condicionados foram imersos em 60 mL de soluções aquosas contendo aproximadamente 10^5 UFC/mL de células vegetativas ou esporos, resultando em quatro diferentes tipos de inóculos: 1) células vegetativas do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea; 2) esporos do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea; 3) células vegetativas da cepa de *B. cereus* ATCC e 4) esporos da cepa de *B. cereus* ATCC. A concentração de 10^5 UFC/mL utilizada neste estudo teve por objetivo simular a máxima população de *B. cereus* presente em leite relatada por diversos autores, que variou de 10^2 a 10^5 UFC/mL (BARTOSZEWICZ et al., 2008; MAGNUSSON; CHRISTIANSSON; SVENSSON, 2007; REYES et al., 2007). Além disso, a presença de *B. cereus* com contagem igual ou superior a 10^5 UFC/g de alimento ou de células totais consumida corresponde a dose necessária relacionada à intoxicação alimentar associada a essa bactéria (BLACKBURN; McCLURE, 2009).

Para a padronização das soluções aquosas (concentração final $\sim 10^5$ UFC/mL), tanto para células vegetativas quanto para esporos, adicionou-se 1% (v/v) das suspensões do *pool* de *B. cereus* ou da cepa de *B. cereus* ATCC 14579 obtidas conforme descrito anteriormente, nas seções 3.2 e 3.3. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 55 °C por 20 horas (LabLine Orbit Environ – Shaker 3527, LabLine Instruments, Melrose Park, IL, EUA) e em seguida os cupons foram retirados para a determinação das células aderidas através da contagem total de células (células vegetativas + esporos) e de esporos conforme descrito posteriormente (seção 3.5.6).

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados e o experimento completo foi repetido três vezes. Utilizou-se um esquema fatorial 3×4 , nos quais o efeito da

matriz condicionante, com três níveis de variação (água, leite UHT desnatado e integral) e do tipo de inóculo, com quatro níveis de variação (células vegetativas do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea; esporos do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea; células vegetativas da cepa de *B. cereus* ATCC e esporos da cepa de *B. cereus* ATCC), bem como da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* em aço inoxidável foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias a um nível de significância de 5%.

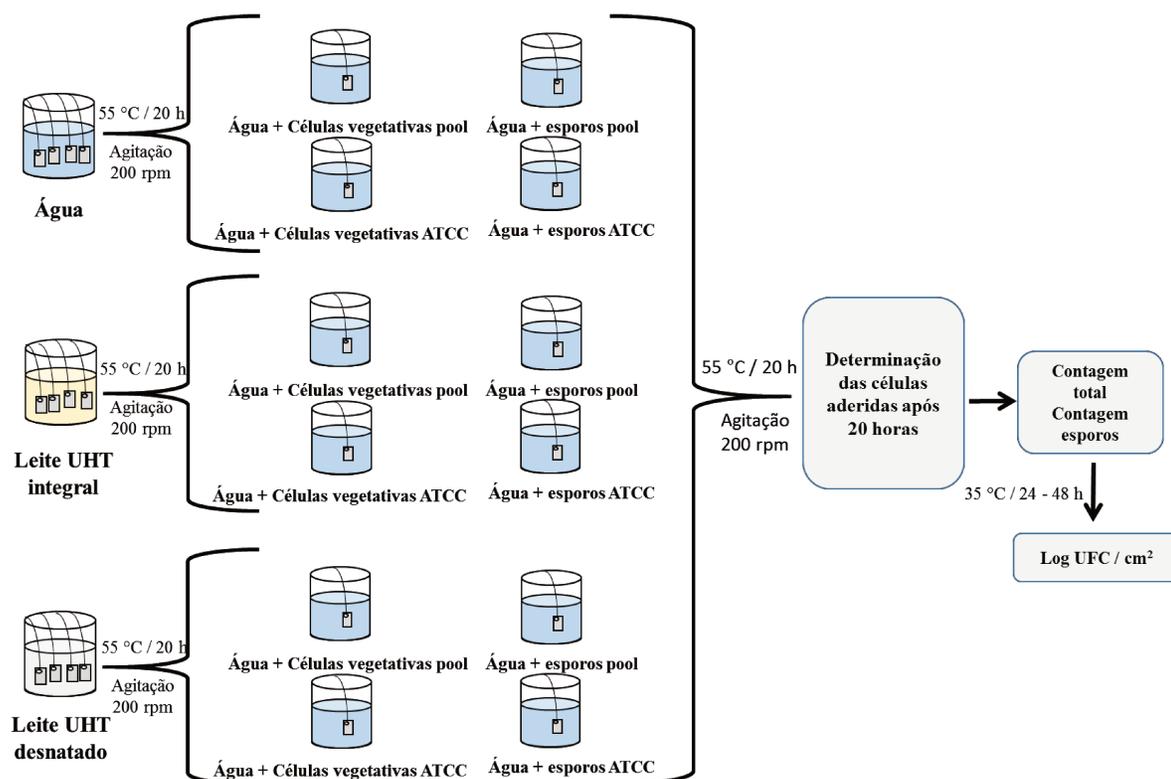


Figura 2. Esquema geral dos experimentos para avaliar o efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes e do tipo de inóculo sobre a adesão e formação de biofilmes por células vegetativas e esporos de *B. cereus*.

3.5.3 Adesão de *B. cereus* em aço inoxidável sem pré-condicionamento da superfície.

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar o efeito do tipo de matriz, do tipo do inóculo, bem como da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilmes por células vegetativas e esporos de *B. cereus*. Da mesma forma que no experimento anterior,

foram avaliadas três matrizes (água, leite UHT desnatado e integral) e quatro tipos de inóculo (células vegetativas do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea; esporos do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea; células vegetativas da cepa de *B. cereus* ATCC e esporos da cepa de *B. cereus* ATCC) visando, neste caso, simular o processo de utilização de matéria-prima contaminada por *B. cereus*. O esquema geral do experimento é apresentado na Figura 3.

Inicialmente, os cupons devidamente preparados (seção 3.4) foram imersos assepticamente em frascos coletores universais estéreis, contendo cada um 60 mL de cada uma das matrizes lácteas e água Ultra Pura estéril (matriz controle), previamente inoculadas (1% v/v) com células vegetativas ou com esporos de *B. cereus* (*pool* dos isolados da indústria láctea e cepa ATCC) para obtenção de meios de cultivo com aproximadamente 10^5 UFC/mL. Os cupons foram imersos de modo que não tocassem as bordas dos frascos, que foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 55 °C por 20 horas (LabLine Orbit Environ – Shaker 3527, LabLine Instruments, Melrose Park, IL, EUA). A escolha das condições de tempo e temperatura utilizadas (55 °C por 20 horas) foi justificada anteriormente na primeira etapa (seção 3.5.2). Após 20 horas, os cupons foram retirados para a determinação das células aderidas através da contagem total de células (células vegetativas + esporos) e de esporos conforme descrito posteriormente (seção 3.5.6).

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados e o experimento completo foi repetido três vezes. Utilizou-se um esquema fatorial 3×4 , nos quais o efeito do tipo de matriz, com três níveis de variação (água, leite UHT desnatado e integral) e do tipo de inóculo, com quatro níveis de variação, (células vegetativas do *pool* dos isolados de *B. cereus*; *pool* de esporos dos isolados de *B. cereus*; células vegetativas da cepa de *B. cereus* ATCC e esporos da cepa de *B. cereus* ATCC), bem como da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* em aço inoxidável foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias a um nível de significância de 5%.

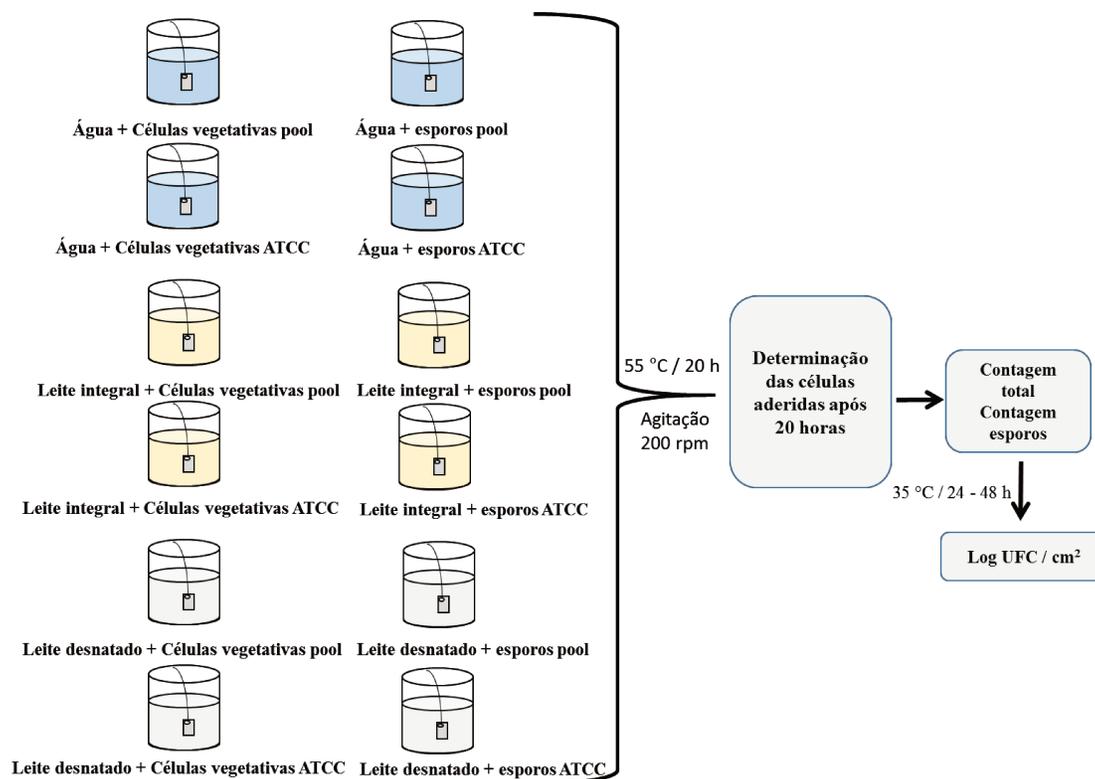


Figura 3. Esquema geral dos experimentos para avaliar o efeito do tipo de matriz e do tipo do inóculo sobre a adesão e formação de biofilmes por células vegetativas e esporos de *B. cereus*.

3.5.4 Adesão de esporos de *B. cereus* em aço inoxidável pré-condicionado ao longo do tempo de exposição

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar o efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes, do meio de inoculação do *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea, do tempo de exposição, bem como das interações desses fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*. O esquema geral do experimento é apresentado na Figura 4. Inicialmente, os cupons devidamente preparados (seção 3.4) foram imersos assepticamente em frascos coletores universais estéreis, contendo cada um 60 mL de duas diferentes matrizes de condicionamento (água ou leite UHT integral) de modo a não tocarem as bordas dos frascos. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 55 °C por 20 horas (LabLine Orbit Environ – Shaker 3527, LabLine Instruments, Melrose Park, IL, EUA). A escolha das condições de tempo e temperatura utilizadas (55 °C por 20 horas) foi justificada anteriormente na primeira etapa (seção 3.5.2). Após 20 horas, os cupons foram

removidos das matrizes e colocados em frascos estéreis contendo água ou leite integral (60 mL) inoculados (1% v/v) do *pool* de esporos de *B. cereus*, com concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 55 °C por 72 horas (LabLine Orbit Environ – Shaker 3527, LabLine Instruments, Melrose Park, IL, EUA). Após 5 minutos (0,08 h), 10, 24, 48 e 72 horas, um cupom foi retirado para a determinação das células aderidas através da contagem total de células (células vegetativas + esporos) e de esporos conforme descrito posteriormente (seção 3.5.6).

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados e o experimento completo foi repetido três vezes. Utilizou-se um esquema fatorial $2 \times 2 \times 5$, no qual o efeito da matriz condicionante, com dois níveis de variação (água e leite UHT integral); do meio de inoculação do *pool* de esporos de *B. cereus*, com dois níveis de variação (água e leite UHT integral) e do tempo de exposição, com cinco níveis de variação (5 min (0,08h), 10, 24, 48 e 72 horas), bem como o efeito da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* em aço inoxidável foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias a um nível de significância de 5%.

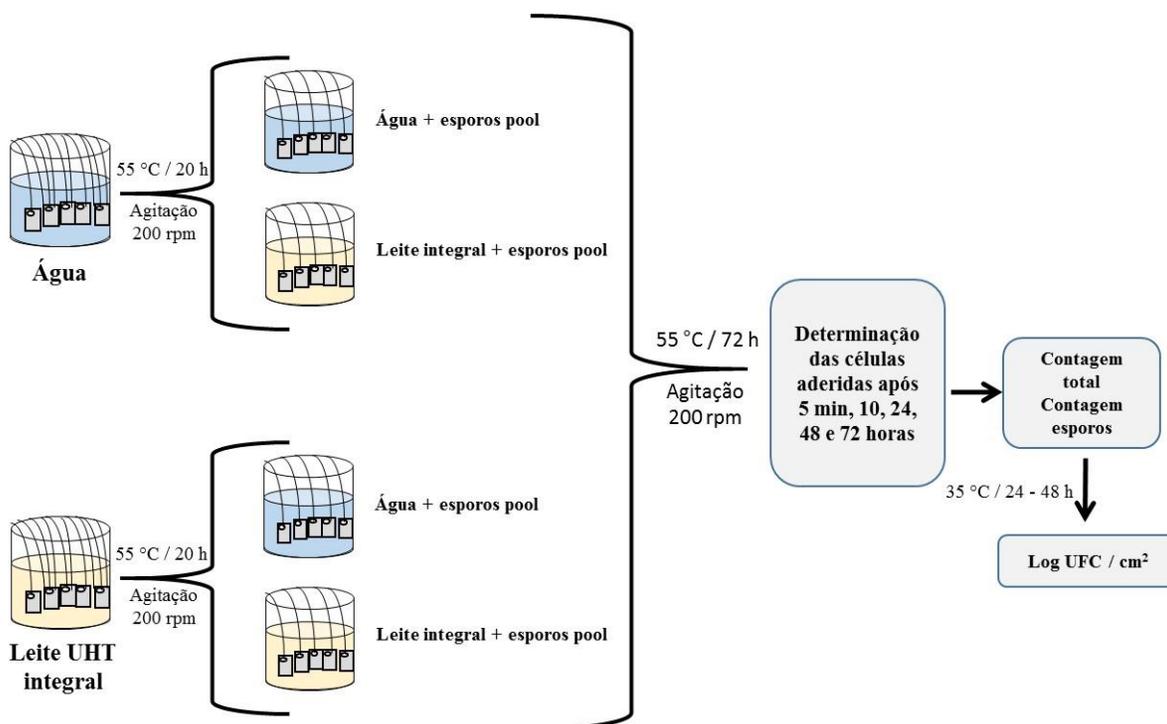


Figura 4. Esquema geral dos experimentos para avaliar o efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes, do meio de inoculação do *pool* de esporos de *B. cereus*, do tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*.

3.5.5 Avaliação de procedimentos de higienização na remoção de biofilmes de esporos de *B. cereus*

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar a eficiência dos procedimentos de limpeza e sanitização na remoção de biofilmes formados pelo *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea. As quatro condições de adesão e formação de biofilmes estudadas na terceira etapa do trabalho foram utilizadas para a formação dos biofilmes e subsequente avaliação da eficiência dos diferentes procedimentos de limpeza e sanitização na remoção dos biofilmes. Inicialmente foram preparados cupons submetidos aos seguintes tratamentos:

1. Cupons condicionados em água (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em água inoculada com *pool* de esporos de *B. cereus* (200 rpm, 55 °C por 24 h), codificado posteriormente como Biofilme *água/água*;
2. Cupons condicionados em água (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em leite UHT integral inoculado com *pool* de esporos de *B. cereus* (200 rpm, 55 °C por 24 h), codificado posteriormente como Biofilme *água/leite integral*;
3. Cupons condicionados em leite UHT integral (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em água inoculada com *pool* de esporos de *B. cereus* (200 rpm, 55 °C por 24 h), codificado posteriormente como Biofilme *leite integral/água* ;
4. Cupons condicionados em leite UHT integral (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em leite UHT integral inoculado com *pool* de esporos de *B. cereus* (200 rpm, 55 °C por 24 h), codificado posteriormente como Biofilme *leite integral/leite integral*.

Para cada condição de adesão e formação de biofilme, após 24 horas, um cupom foi retirado dos meios de cultivo e imediatamente submetido em cada um dos nove diferentes procedimentos de limpeza e sanitização conforme descritos na Tabela 3. Os procedimentos utilizados seguiram metodologia descrita por (Fernandes; Kabuki; Kuaye, 2015), com modificações.

Tabela 3. Procedimentos de limpeza e sanitização utilizados na remoção de biofilme de esporos de *B. cereus*.

Procedimentos de limpeza e sanitização	Etapas	Descrição
Limpeza com tensoativo aniônico	1. Pré- enxague 2. Detergente tensoativo aniônico 3. Enxague final	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 7 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Limpeza com tensoativo aniônico e detergente ácido	1. Pré- enxague 2. Detergente tensoativo aniônico 3. Enxague 4. Detergente ácido 5. Enxague final	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 7 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Limpeza com detergente ácido e tensoativo aniônico	1. Pré- enxague 2. Detergente ácido 3. Enxague 4. Detergente tensoativo aniônico 5. Enxague final	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 7 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Sanitização	1. Pré- enxague 2. Sanitizante (ácido peracético)	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Sanitização	1. Pré- enxague 2. Sanitizante (hipoclorito de sódio)	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Limpeza com tensoativo aniônico + sanitização	1. Pré- enxague 2. Detergente tensoativo aniônico 3. Enxague 4. Sanitizante (ácido peracético)	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 7 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Limpeza com tensoativo aniônico + sanitização	1. Pré- enxague 2. Detergente tensoativo aniônico 3. Enxague 4. Sanitizante (hipoclorito de sódio)	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 7 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Limpeza com tensoativo aniônico e detergente ácido + sanitização	1. Pré- enxague 2. Detergente tensoativo aniônico 3. Enxague 4. Detergente ácido 5. Enxague 6. Sanitizante (ácido peracético)	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 7 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm
Limpeza com tensoativo aniônico e detergente ácido + sanitização	1. Pré- enxague 2. Detergente tensoativo aniônico 3. Enxague 4. Detergente ácido 5. Enxague 6. Sanitizante (hipoclorito de sódio)	1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 7 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à 40 °C, agitação constante de 340 rpm 1 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm 10 min à T ambiente, agitação constante de 340 rpm

Fonte: Adaptado de (FERNANDES; KABUKI; KUAYE, 2015).

Para as etapas de limpeza foram utilizados detergente tensoativo aniônico a base de linear alquilbenzeno sulfonato de sódio (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. LTDA, Uberlândia, MG) a 3,0% (v/v), pH 6,0 e detergente ácido a base de ácido nítrico (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. LTDA) a 0,4% (v/v), pH 1,8. Nas etapas de sanitização, foram utilizadas as soluções de hipoclorito de sódio a 0,2% (v/v, 200 mg/L) de Cloro Residual Total (CRT), pH 7,0 (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. LTDA) e ácido peracético a 0,2% (v/v, 300 mg/L), pH 2,8 (Start Química, Lima & Pergher Ind. Com. e Rep. LTDA). Os detergentes e os sanitizantes foram preparados de acordo com as indicações dos fabricantes.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes da realização dos experimentos em frascos de vidro estéreis e 10 mL de cada solução (detergente ou sanitizante) foram transferidos para tubos de ensaio estéreis. As etapas de pré-enxague, enxague e enxague final foram realizadas em tubos de ensaio estéreis contendo 10 mL de água Ultra Pura estéril. Após a realização dos procedimentos de limpeza e sanitização, nos quais foram utilizados detergente ácido, hipoclorito de sódio e ácido peracético, os cupons foram transferidos para tubos contendo 10 mL de água peptonada 0,1% (p/v) que foram suplementados com um agente neutralizante (tiosulfato de sódio, 1% p/v). No caso da utilização do detergente tensoativo aniônico, os cupons foram transferidos diretamente para tubos contendo apenas 10 mL de água peptonada 0,1% (p/v). Em seguida, todos os cupons foram submetidos a vortex por dois minutos para remoção das células sésseis (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998). As soluções resultantes foram submetidas às diluições seriadas para contagem total de células (células vegetativas + esporos) e de esporos conforme descrito posteriormente (seção 3.5.5). Para cada condição de adesão e formação de biofilme, um cupom foi utilizado como controle da população inicial de *B. cereus* e não foi submetido a nenhum procedimento de limpeza e sanitização.

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados e o experimento completo foi repetido três vezes. O efeito dos procedimentos de limpeza e sanitização (descritos na Tabela 3) na remoção dos biofilmes formados pelo *pool* de esporos de *B. cereus* em aço inoxidável foi avaliado separadamente, para cada condição de adesão e formação de biofilme, por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias a um nível de significância de 5%.

3.5.6 Determinação do número de células aderidas

A avaliação da adesão e formação de biofilmes foi realizada por meio da técnica de contagem em placas. Para as três etapas iniciais, após cada tempo determinado, um cupom de aço inoxidável foi retirado do meio e imerso, sem agitação por três vezes em 10 mL de água peptonada (0,1% p/v) visando a remoção das células planctônicas. Em seguida, o cupom foi imerso em um tubo contendo 10 mL de água peptonada (0,1% p/v) e submetido à vortex por dois minutos para a remoção das células sésseis (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998). Para todas as etapas de adesão e formação de biofilme, a partir da solução resultante, foram realizadas as diluições seriadas para a realização da contagem total de células (células vegetativas + esporos) e de esporos. Para a contagem total de células, o plaqueamento foi realizado em profundidade em ágar TSA com incubação a 35 ± 1 °C por 24 a 48 horas (LEE et al., 2010). Para a contagem de esporos, as amostras foram submetidas à um tratamento térmico de 80 ± 1 °C por 12 minutos, seguido de plaqueamento em profundidade em ágar TSA suplementado com 0,2% (p/v) de amido solúvel e incubação a 35 ± 1 °C por 24 a 48 horas (RUECKERT; RONIMUS; MORGAN, 2005). A capacidade de adesão e formação de biofilmes por *B. cereus* foi quantificada em unidades formadoras de colônias por cm² (UFC/cm²).

Em todas as etapas, imediatamente após a inoculação da suspensão de células vegetativas ou esporos e em todos os tempos de avaliação da adesão e formação de biofilme, foi realizada a contagem total de células (células vegetativas + esporos) e de esporos dos meios de cultivo como forma de controle da população. Para a contagem total de células, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada (0,1% p/v) e o plaqueamento foi realizado em profundidade em ágar TSA com incubação a 35 ± 1 °C por 24 a 48 horas (LEE et al., 2010). Para a contagem de esporos, as amostras foram submetidas à um tratamento térmico de 80 ± 1 °C por 12 minutos, seguido de plaqueamento em profundidade em ágar TSA suplementado com 0,2% (p/v) de amido solúvel e incubação a 35 ± 1 °C por 24 a 48 horas (RUECKERT; RONIMUS; MORGAN, 2005).

3.6 Caracterização físico-química da superfície dos esporos

3.6.1 Avaliação do Potencial Zeta

A carga elétrica de superfície dos esporos de *B. cereus* foi avaliada por meio da determinação do potencial zeta de acordo com metodologia adaptada de Ahimou et al. (2001) e Palmer et al. (2010). As suspensões de esporos de cada cepa (quatro isolados da indústria láctea e ATCC 14579) e do *pool* de *B. cereus* foram ressuspensas em água peptonada (0,1% p/v), diluídas e padronizadas para uma absorbância (densidade óptica) entre 0,5 e 0,6 à 600 nm em espectrofotômetro (Beckman DU-70, Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA). O potencial zeta de cada suspensão de esporo foi medido em intervalos de pH de 2,0 a 7,0, por meio de ajuste com soluções de NaOH (0,5 M) ou HCl (0,5 M). As análises foram realizadas em duplicata e as determinações do potencial zeta foram realizadas utilizando o Malvern Zetasizer (Nano-Z, Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK).

3.6.2 Avaliação da hidrofobicidade

As metodologias adaptadas de Rosenberg; Gutnick; Rosenberg (1980) e Seale et al. (2010) foram utilizadas para avaliar a hidrofobicidade da superfície dos esporos de *B. cereus* através do teste de adesão microbiana à hidrocarbonetos (MATH), utilizando hexadecano (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA). As suspensões de esporos de cada cepa (quatro isolados da indústria láctea e ATCC 14579) e do *pool* de *B. cereus* foram ressuspensas em água peptonada (0,1% p/v), diluídas e padronizadas para uma absorbância (densidade óptica) entre 0,6 e 1,0 à 600 nm em espectrofotômetro (Beckman DU-70, Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA). O valor obtido nessa etapa é considerado a absorbância inicial (A_i), sendo que foram realizadas cinco leituras para cada suspensão de esporo. Em seguida, 2 mL de cada suspensão foi adicionado em 1 mL de hexadecano em tubos rosqueáveis de vidro e submetidos à vortex por um minuto. As amostras foram incubadas à 37 °C por 10 minutos, submetidas novamente à vortex por dois minutos e incubadas à 20 °C por 30 minutos para permitir a separação das fases. Após estas etapas, a fase aquosa foi cuidadosamente removida com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para uma cubeta, na qual a absorbância foi

medida por cinco vezes à 600 nm (Absorbância final - Af). A porcentagem de hidrofobicidade (% h) foi determinada a partir da absorbância da suspensão inicial (Ai) e da absorbância da fase aquosa após mistura com hexadecano (Af), conforme apresentado na Equação 3:

$$\% h = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

O teste de adesão microbiana depende da adesão preferencial das células bacterianas a hidrocarbonetos a partir de uma suspensão aquosa de células. Considera-se uma superfície celular hidrofóbica quando ocorre a remoção de mais que 50 % da suspensão celular da fase aquosa para a fase orgânica (KARUNAKARAN; BIGGS, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adesão de *B. cereus* em aço inoxidável pré-condicionado com diferentes matrizes

O efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes, do tipo de inóculo, bem como da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células e contagem de esporos é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do efeito do condicionamento do aço inoxidável com diferentes matrizes, do tipo de inóculo, e da interação entre esses fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*.

Fatores	Valores de <i>p</i>		
	GL	Contagem total de células	Contagem Esporos
Matrizes de condicionamento*	2	0,059	0,002
Tipo de Inóculo**	3	< 0,0001	< 0,0001
Matrizes × Tipo de Inóculo	6	< 0,0001	< 0,0001

* Matrizes de condicionamento do aço inoxidável: Água, Leite desnatado, Leite integral.

** Tipo de Inóculo: *Pool* de células vegetativas, *Pool* de esporos, Células vegetativas ATCC, Esporos ATCC.

GL (Graus de Liberdade); *p* (probabilidade de significância < 0,05).

Observa-se na Tabela 4 que a interação entre as matrizes de condicionamento do aço inoxidável e o tipo de inóculo influenciou significativamente a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* avaliada por contagem total de células e contagem de esporos. O efeito destas interações é apresentado na Figura 5 a e b, na qual observa-se que não houve adesão de células vegetativas de *B. cereus* ao aço inoxidável condicionado com água, leite desnatado ou leite integral, quando se inoculou células vegetativas, tanto do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea como da cepa de *B. cereus* ATCC 14579.

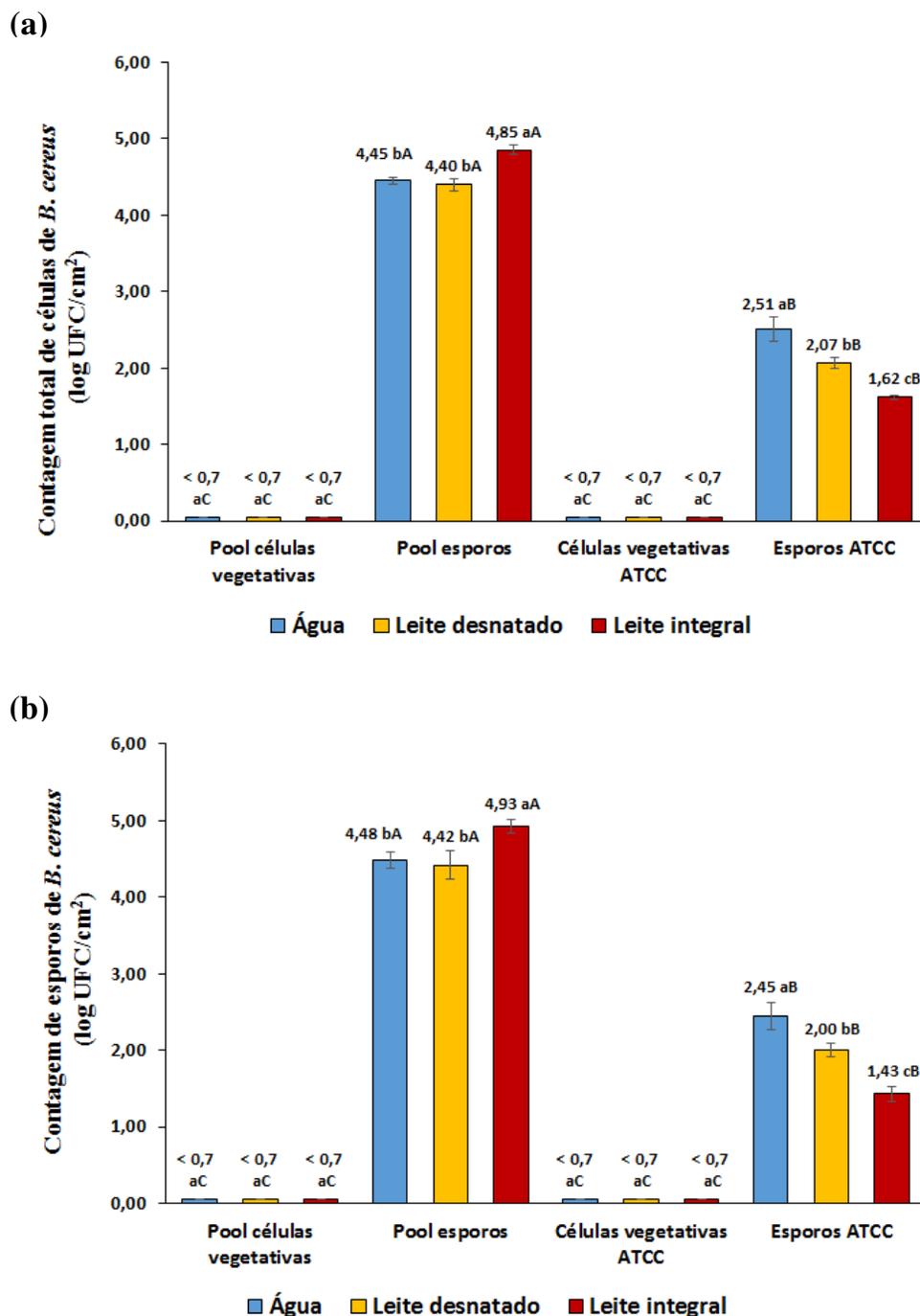


Figura 5. Efeito da interação entre as matrizes de condicionamento do aço inoxidável e o tipo de inóculo sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, para (a) contagem total de células (log UFC/cm²) e (b) contagem de esporos (log UFC/cm²), (n=3).

^{A,B} Para cada matriz de condicionamento, letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{a,b} Para cada tipo de inóculo, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

[§]Limite de detecção do método = 0,7 log UFC/cm². Desvio padrão não estabelecido.

De acordo com Lindsay; Flint (2009), o estudo do processo de formação de biofilme por bactérias formadoras de esporos, tais como *B. cereus*, é um desafio, uma vez que células vegetativas e esporos apresentam distintas morfologias, cada um com seus diferentes mecanismos e habilidade de adesão. Assim, Parkar et al. (2001), reportaram que células vegetativas possuem menor capacidade de adesão ao aço inoxidável quando comparadas à adesão de esporos da mesma bactéria.

A não adesão de células vegetativas de *B. cereus* observada neste trabalho quando comparada a outros autores pode estar relacionada à temperatura utilizada no estudo (55 °C), que possivelmente inativou esse micro-organismo, que é mesofílico com temperatura ótima de crescimento ente 25 e 37 °C (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Em estudos anteriores nos quais se observou adesão de células vegetativas de *B. cereus*, as temperaturas utilizadas na formação de biofilme foram de 25 °C (WILLIAMS; FLETCHER, 1996), 30 °C (ELHARIRY, 2011; KARUNAKARAN; BIGGS, 2011) e 37 °C (PAGEDAR; SINGH, 2012).

A não adesão das células vegetativas de *B. cereus* associada às contagens total de células (células vegetativas + esporos) e de esporos similares (Figura 5 a e b), indicaram que a adesão e formação de biofilme foi proveniente de esporos, e não de células vegetativas. Scott et al. (2007), também observaram valores similares para contagem total de células e de esporos de micro-organismos termófilos em amostras de leite, sugerindo que as bactérias presentes nas amostras estavam predominantemente na forma de esporos.

No que diz respeito ao presente estudo, independente da matriz utilizada para o condicionamento do aço inoxidável, a adesão e formação de biofilme foi obtida por inóculos que continham apenas esporos, tanto do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea como da cepa ATCC 14579. Quando se inoculou o *pool* de esporos de *B. cereus*, a adesão e formação de biofilme avaliada por contagem total de células e de esporos foi, em média, de 4,57 e 4,61 log UFC/cm², respectivamente. No caso da inoculação com esporos da cepa ATCC essas contagens foram de 2,07 e 1,96 log UFC/cm², respectivamente. As diferenças de 0,04 e 0,11 log UFC/cm² observadas entre as contagens total de células e de esporos, quando se inoculou o *pool* de esporos ou a cepa ATCC, respectivamente, podem ser atribuídas às características individuais e genéticas, além do método de preparo da suspensão de esporos, que tem por objetivo alcançar em torno de 90 a 95% de esporulação. Desta forma,

a discussão dos resultados com relação à adesão e formação de biofilme foi baseada na contagem de esporos.

Vale ressaltar a importância dos esporos de *B. cereus*, uma vez que nas temperaturas comumente utilizadas no processamento de produtos lácteos (45-75 °C), (RÜCKERT; RONIMUS; MORGAN, 2004), a forma esporulada é a usualmente encontrada devido à elevada resistência dos esporos ao calor.

Observa-se na Figura 5 b, que o *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea ou da cepa ATCC 14579 apresentaram adesão ao aço inoxidável condicionado com todas as matrizes estudadas, sendo que o comportamento de adesão foi diferente para as matrizes e para os tipos de inóculo avaliados. Os esporos da cepa ATCC apresentaram menor adesão em todas as matrizes quando comparados ao *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea, sugerindo uma maior capacidade de adesão dos isolados da indústria, uma vez que podem ter sido expostos a condições adversas devido a seleção pelo meio em que foram isolados (ELHARIRY, 2011).

Os esporos da cepa ATCC apresentaram maior adesão em água (2,45 log UFC/cm²) do que em leite desnatado (2,00 log UFC/cm²) e leite integral (1,43 log UFC/cm²), sugerindo que o condicionamento da superfície do aço inoxidável com matrizes lácteas não favoreceu a adesão dos esporos dessa cepa (Figura 5 b).

Resultados similares foram encontrados por Parkar et al. (2001), que observaram que o condicionamento do aço inoxidável com leite em pó reconstituído a 1 e 10% de sólidos totais diminuiu a adesão de esporos de *Bacillus licheniformis* quando comparado à superfície de aço inoxidável sem prévio condicionamento. Diferente do observado para o esporo da cepa ATCC, o *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea apresentou maior adesão ao aço inoxidável condicionado com leite integral (4,93 log UFC/cm²) do que com leite desnatado (4,42 log UFC/cm²) ou água (4,48 log UFC/cm²), cuja adesão não diferiu significativamente entre si.

A menor adesão de esporos da cepa de *B. cereus* ATCC quando comparado ao *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea, em qualquer uma das matrizes avaliadas, pode estar relacionada à característica das distintas cepas, uma vez que a literatura é farta no que se refere à sugestão de que a adesão ao aço inoxidável é cepa-dependente (FAILLE; FONTAINE; BÉNÉZECH, 2001; SEALE et al., 2008; FAILLE et al., 2010a; FAILLE et al., 2010b; ELHARIRY, 2011). Associada à característica cepa-dependente, a diferente

composição das três matrizes de condicionamento pode ter contribuído para diferentes camadas formadas nas superfícies do aço inoxidável, o que provavelmente resultaria em diferentes comportamentos de adesão das bactérias à essas superfícies (DAT et al., 2014).

Assim como observado nesse estudo, Faille et al. (2010a) reportaram que esporos da cepa de referência de *B. cereus* ATCC 14579 apresentaram menor adesão em aço inoxidável quando comparados à esporos de *B. cereus* que foram isolados de processamento de produtos lácteos, de ambiente e paciente com sintomas diarreicos. Os autores sugeriram que a maior adesão de cepas de *B. cereus* que foram isolados, é que podem existir mudanças na superfície dos esporos devido às condições ambientais que afetariam posteriormente as propriedades de adesão.

Em relação ao *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea, é possível que a maior adesão ao aço inoxidável condicionado com leite integral se deva a presença da gordura na matriz de condicionamento, a qual é hidrofóbica, assim como a superfície do esporo, favorecendo sua adesão (BARNES et al., 1999). Além disso, a gordura do leite é o constituinte de maior diâmetro (2.000-6000 nm), quando comparado à micela de caseína (360-300 nm), às proteínas do soro (4-6 nm) ou a lactose (0,5 nm) (Fennema; Damodaran; Parkin, 2010), o que pode ter favorecido a criação de uma superfície propícia para a adesão.

O leite integral contém surfactantes naturais e fosfolipídios que são compostos de superfície ativa presentes na membrana do glóbulo de gordura do leite. Desta forma, Shaheen et al. (2010), acreditam que a capacidade de algumas cepas de *B. cereus* em formar biofilmes na presença de leite integral está associada a esses compostos de superfície ativa que podem agir como surfactante necessário para a formação de biofilme por algumas cepas de *B. cereus*.

Vale ressaltar que a membrana do glóbulo de gordura do leite contém proteínas, que além do caráter anfifílico, possuem estrutura e propriedades diferentes das caseínas e proteínas do soro presentes no leite. Essas proteínas específicas, mesmo em baixo nível (1 a 4% da proteína total do leite) também podem ter contribuído para a adesão do *pool* de esporos de *B. cereus* devido às suas propriedades surfactantes (FOX; MCSWEENEY, 1998; ROMBAUT; CAMP; DEWETTINCK, 2006).

Vale ressaltar que, segundo Rosmaninho et al. (2007), o *fouling* em indústrias de processamento de produtos lácteos se inicia, embora em nível molecular e invisível a olho nu, assim que o produto entra em contato com superfícies de aço inoxidável. Esse *fouling* ou pré-condicionamento da superfície do aço inoxidável pode alterar as características das

superfícies devido aos constituintes presentes nas matrizes, o que implica na mudança de comportamento da superfície em relação ao processo de adesão bacteriana (BERNARDES et al., 2012).

Em resumo, no caso desse estudo cujo objetivo foi simular a obtenção de superfícies de aço inoxidável cobertas com filme condicionante similar às condições encontradas no processamento de produtos lácteos (55 °C), os resultados indicaram que as células vegetativas de *B. cereus* não aderiram ao aço inoxidável, o que indica a maior preocupação das indústrias com a presença dos esporos dessa bactéria. Neste caso, quando se utilizou esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea, estes apresentaram maior adesão ao aço inoxidável condicionado com água, leite desnatado e leite integral quando comparados à adesão de uma cepa de referência do mesmo micro-organismo (ATCC 14579).

Esses resultados estão de acordo com o observado por Scott et al. (2007) e Burgess et al. (2009), que afirmaram que o desenvolvimento de esporos é o fator mais preocupante para as indústrias lácteas, devido principalmente ao seu mecanismo de resistência à diversas condições adversas.

No que diz respeito às diferentes matrizes utilizadas no trabalho, o leite integral utilizado como matriz condicionante do aço inoxidável conferiu maior adesão do *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea, o que sugere que o processamento dessa matriz láctea ou sub-produtos contendo gordura podem fornecer condições para maior adesão de esporos às superfícies dos equipamentos utilizados no processamento.

4.2 Adesão de *B. cereus* em aço inoxidável sem pré-condicionamento da superfície.

O efeito do tipo de matriz, do tipo de inóculo, bem como da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células e contagem de esporos é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do efeito das matrizes, do tipo de inóculo, e da interação entre esses fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*.

Fatores	Valores de <i>p</i>		
	GL	Contagem total de células	Contagem Esporos
Tipo de Matriz*	2	< 0,0001	< 0,0001
Tipo de Inóculo**	3	< 0,0001	< 0,0001
Tipo de Matriz × Tipo de Inóculo	6	< 0,0001	< 0,0001

* Tipo de Matriz: Água, Leite desnatado, Leite integral.

** Tipo de Inóculo: *Pool* células vegetativas, *Pool* esporos, Células vegetativas ATCC, Esporos ATCC. GL (Graus de Liberdade); *p* (probabilidade de significância < 0,05).

Observa-se na Tabela 5 que o tipo de matriz, o tipo de inóculo, bem como a interação entre esses fatores afetaram significativamente a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliada por contagem total de células e contagem de esporos. A avaliação do efeito da interação entre o tipo de matriz e o tipo de inóculo sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* (Figura 6 a e b) mostrou que nas condições estudadas (55 °C), as células vegetativas de *B. cereus* não aderiram ao aço inoxidável quando na forma de *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea ou da cepa ATCC 14579.

Além disso, assim como observado anteriormente na primeira etapa, independente da matriz utilizada, a adesão e formação de biofilme foi obtida por inóculos que continham apenas esporos, tanto do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea como da cepa ATCC 14579, uma vez que foram observadas contagens total de células e de esporos similares. Neste caso, a adesão e formação de biofilme avaliada por contagem total de células e de esporos foi, em média, de 3,68 e 3,62 log UFC/cm² quando se inoculou o *pool* de esporos de *B. cereus*, respectivamente e, 2,38 e 2,04 log UFC/cm² no caso da inoculação com esporos da cepa ATCC. Desta forma, a discussão dos resultados com relação à adesão e formação de biofilme foi baseada novamente na contagem de esporos.

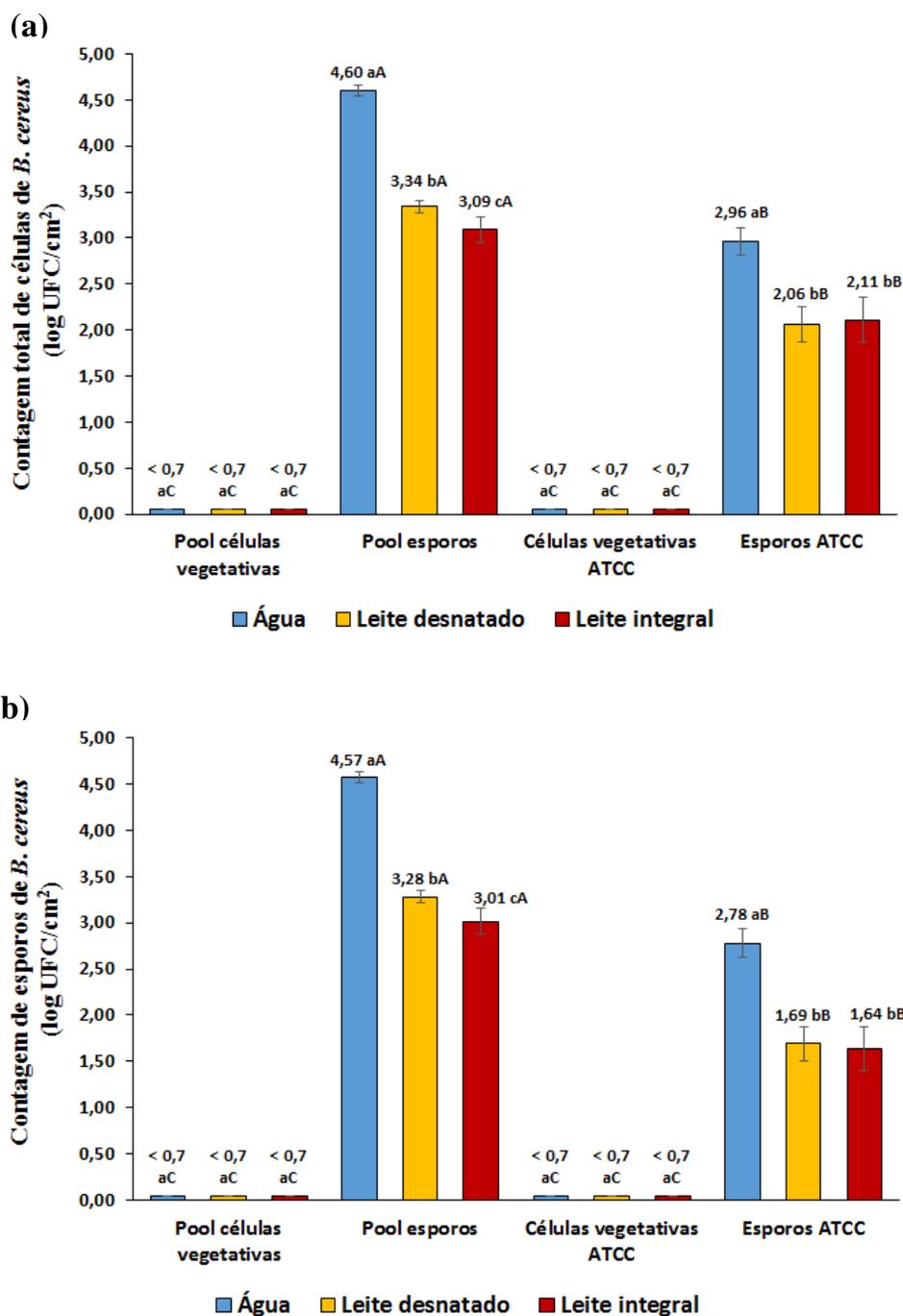


Figura 6. Efeito da interação entre o tipo de matriz e o tipo de inóculo sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, para (a) contagem total de células (log UFC/cm²) e (b) contagem de esporos (log UFC/cm²), (n=3).

^{A,B} Para cada matriz, letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

^{a,b} Para cada tipo de inóculo, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

[§]Limite de detecção do método = 0,7 log UFC/cm². Desvio padrão não estabelecido.

Assim como observado quando o aço inoxidável foi condicionado em água, leite desnatado ou integral, o *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea apresentou maior adesão do que os esporos da cepa ATCC em todas as matrizes avaliadas (Figura 6 b). No entanto, diferente do observado anteriormente, ambos os inóculos apresentaram significativamente maior adesão ao aço inoxidável quando foram inoculados em água do que quando inoculados nas matrizes lácteas. A maior adesão de *B. cereus* isolados de linhas de processamento de produtos lácteos quando inoculados em água do que em leite ou caldo TSB também foi observado por Shaheen et al. (2010).

Como pode ser observado na Figura 6 b, o *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea apresentou maior adesão em aço inoxidável quando inoculado em água (4,57 log UFC/cm²) do que em leite desnatado (3,28 log UFC/cm²) ou leite integral (3,01 log UFC/cm²). Pode-se observar que os valores encontrados para a adesão dos esporos inoculados em água indicaram que quase todos os esporos presentes na suspensão inicial (5 log UFC/mL) aderiram ao aço inoxidável. O mesmo comportamento foi reportado por Nanasaki et al. (2010), que observaram que após 60 min, praticamente todos os esporos que foram inoculados em água aderiram ao aço inoxidável. No caso dos esporos da cepa ATCC não se observou diferença significativa na adesão ao aço inoxidável quando inoculados nas matrizes lácteas (1,69 e 1,64 log UFC/cm² para leite desnatado e integral, respectivamente) que foi menor do que a adesão quando inoculados em água (2,78 log UFC/cm²).

Neste estudo, ao avaliar diferentes matrizes como meios de cultivo, a maior adesão em aço inoxidável quando *B. cereus* foi inoculado em água pode sugerir que existe uma competição do micro-organismo e da matriz láctea por sítios de ligação presentes na superfície do aço inoxidável, sugerindo que houve uma redução no número de sítios para adesão da bactéria.

Além disso, *B. cereus* pode ter maior facilidade de adesão quando o meio de cultivo foi água, uma vez que praticamente não existe interferência de constituintes que poderiam alterar as propriedades de superfície que influenciariam na adesão. O leite desnatado e integral possui constituintes, como proteínas e gorduras, que podem contribuir para a alteração das propriedades físico-químicas da superfície do aço inoxidável que possivelmente influenciaria na adesão em maior ou menor grau de *B. cereus* (BERNARDES et al., 2012).

No caso do *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea inoculado em leite integral, acredita-se que a menor adesão ocorreu pelo fato da competição pelo aço

inoxidável entre a gordura presente no leite integral (constituente hidrofóbico) e o micro-organismo que também possui uma superfície hidrofóbica, além da própria interação entre o leite e o esporo.

Os valores encontrados nesse estudo, assim como na primeira etapa, sugerem que a adesão de *B. cereus* ao aço inoxidável foi cepa-dependente, sendo amplamente relatado por diversos autores (FAILLE; FONTAINE; BÉNÉZECH, 2001; SEALE et al., 2008; FAILLE et al., 2010a; FAILLE et al., 2010b; ELHARIRY, 2011). Wijman et al. (2007) observaram que as duas cepas sequenciadas de *B. cereus* ATCC 14579 e ATCC 10987 apresentaram comportamento de formação de biofilme diferentes, uma vez que a cepa ATCC 10987 foi capaz de formar biofilme em microplacas de poliestireno contendo caldo Luria Bertani à 30 °C, enquanto que a cepa ATCC 14579 não formou biofilme nas mesmas condições avaliadas.

Faille et al. (2010b) sugeriram que o tipo de cepa utilizada, mesmo sendo da mesma espécie, foi responsável por aproximadamente 86% de variação ao aço inoxidável, uma vez que quando inocularam uma suspensão de aproximadamente 10^5 esporos de *B. cereus* /mL em água, os autores observaram que a adesão ao aço inoxidável variou entre 3 e 5 log UFC/cupom, dependendo da cepa. Resultados similares também foram encontrados por Tauveron et al. (2006) quando inocularam uma suspensão de aproximadamente 10^5 esporos de *B. cereus* /mL em água e observaram que a adesão ao aço inoxidável variou entre 4 e 6 log UFC/cm², dependendo da cepa.

Em resumo, no primeiro conjunto de experimentos, o objetivo foi simular as condições de processamento de produtos lácteos, avaliando o efeito do filme condicionante (lácteo ou não) sobre a habilidade de adesão e formação de biofilme por células vegetativas ou esporos de *B. cereus* à superfície do aço inoxidável. O segundo conjunto de experimentos teve por objetivo simular as condições de processamento de produtos lácteos através da entrada de matéria prima contaminada por células vegetativas ou esporos de *B. cereus* e seu efeito na adesão e formação de biofilme por esse micro-organismo em aço inoxidável. Na simulação das condições de processamento de produtos lácteos utilizadas no estudo (55 °C/ 20 h) não se observou adesão de células vegetativas de *B. cereus* à superfície de aço inoxidável em nenhuma das duas etapas. Além disso, a maior adesão ao aço inoxidável foi observada pelo *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea em qualquer condição avaliada neste trabalho.

No caso do condicionamento da superfície do aço inoxidável, a maior adesão foi observada após utilizar o leite integral como matriz condicionante, possivelmente pela melhor fixação do esporo nessa matriz. Por outro lado, a menor adesão do esporo foi observada quando o *pool* de *B. cereus* foi veiculado no leite integral sem prévio condicionamento da superfície. Em outras palavras, a presença da gordura na superfície condicionante favorece a adesão, entretanto, sua presença numa matriz contaminada, desfavorece a adesão de esporos de *B. cereus* à superfície do aço inoxidável. Isso pode ser explicado pelo fato de que a gordura presente na matriz condicionante (leite integral) do aço inoxidável possui afinidade pelo micro-organismo que foi inoculado previamente em solução aquosa, o que possivelmente favoreceu a adesão. Enquanto que, quando o esporo foi inoculado no leite integral, a gordura presente no leite e o esporo (ambos hidrofóbicos) competiram por sítios de ligação presentes no aço inoxidável, o que pode ter desfavorecido a adesão do esporo.

A partir dos resultados obtidos e apresentados na primeira etapa (com condicionamento do aço inoxidável) e na segunda etapa (sem condicionamento do aço inoxidável), observou-se que o *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea apresentou adesão média de 4,61 e 3,62 log UFC/cm², respectivamente, indicando condições de adesão mais favoráveis quando o aço inoxidável foi condicionado com diferentes matrizes. O condicionamento com leite integral favoreceu significativamente a adesão de *B. cereus* quando comparado ao condicionamento com outras matrizes, conforme apresentado anteriormente na Figura 5. Enquanto que, o condicionamento com água e com leite desnatado conferiram significativamente a mesma adesão de esporos de *B. cereus*. Sendo assim, a continuação do trabalho, teve por objetivo avaliar o efeito do condicionamento do aço inoxidável com uma matriz láctea (leite integral) e uma matriz não láctea (água), do meio de inoculação do *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea (água e leite integral) e do tempo de exposição (5min, 10, 24, 48 e 72 h) sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*.

4.3 Adesão de esporos de *B. cereus* em aço inoxidável pré-condicionado ao longo do tempo de exposição

O efeito das matrizes de condicionamento do aço inoxidável, dos meios de inoculação, do tempo de exposição, bem como da interação destes fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células e contagem de esporos é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Resumo da análise de variância (ANOVA) para avaliação do efeito das matrizes de condicionamento do aço inoxidável, dos meios de inoculação, do tempo de exposição e das interações entre esses fatores sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*.

Fatores	Valores de <i>p</i>		
	GL	Contagem total de células	Contagem Esporos
Matrizes de Condicionamento*	1	0,756	0,161
Meios de Inoculação**	1	< 0,0001	< 0,0001
Tempo de Exposição***	4	< 0,0001	< 0,0001
Matrizes de Condicionamento × Meio de Inoculação	1	0,400	0,025
Matrizes de Condicionamento × Tempo de Exposição	4	0,018	0,053
Meio de Inoculação × Tempo de Exposição	4	0,001	< 0,0001
Matrizes × Meio de Inoculação × Tempo de Exposição	4	0,355	0,154

* Matrizes de Condicionamento: Água, Leite integral

** Meios de Inoculação: Água inoculada com *pool* de esporos, Leite integral inoculado com *pool* de esporos

***Tempo de exposição: 5min (0,08h), 10, 24, 48 e 72 h.

GL (Graus de Liberdade); *p* (probabilidade de significância < 0,05).

Pode-se observar na Tabela 6 que a interação entre os fatores matrizes de condicionamento, meios de inoculação e tempo de exposição não afetou significativamente a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliada tanto por contagem total de células como por contagem de esporos.

Com relação aos efeitos separados, a Figura 7 apresenta a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células e contagem de esporos para as matrizes de condicionamento, meios de inoculação e tempo de exposição.

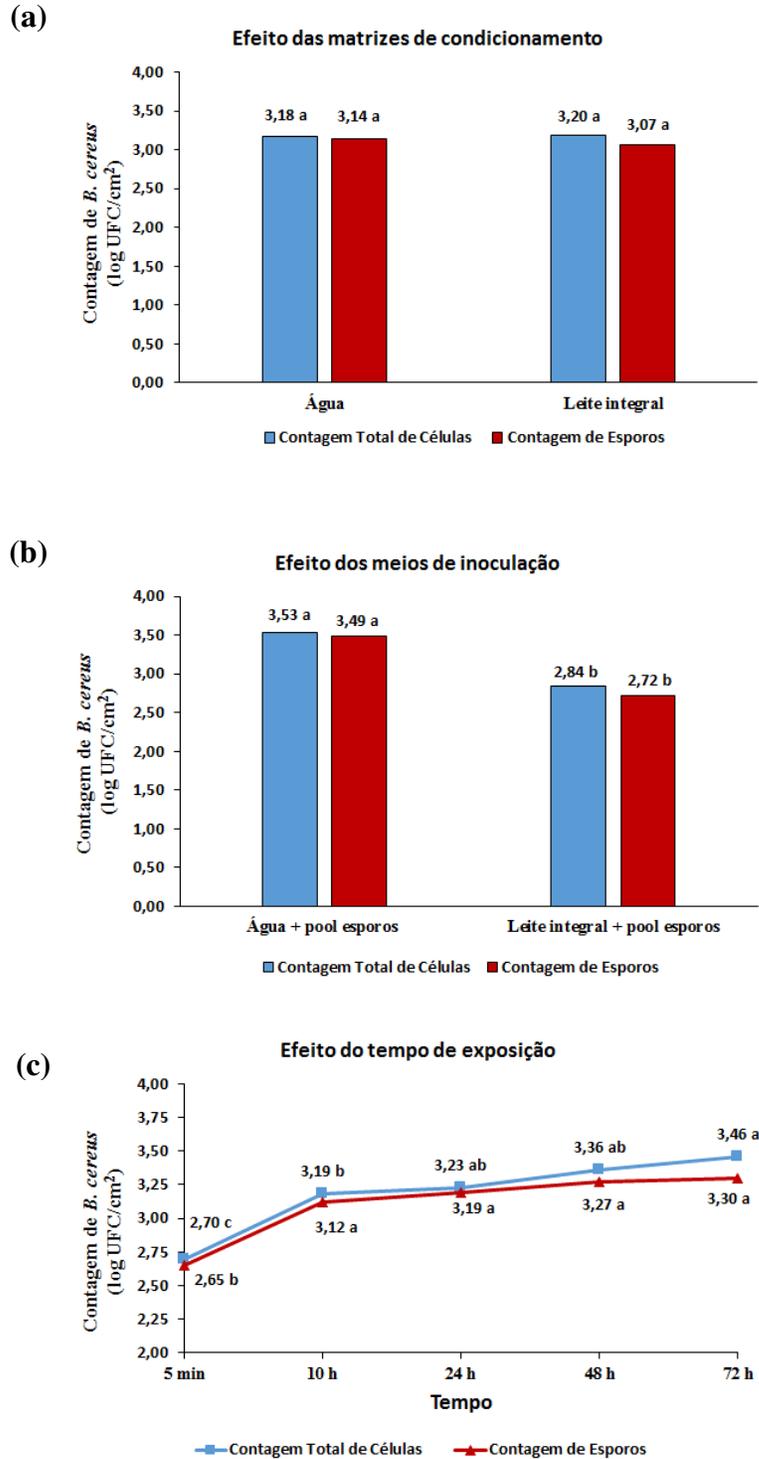


Figura 7. Efeito das (a) matrizes de condicionamento, (b) meios de inoculação e (c) tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células e contagem de esporos (log UFC/cm²) (n = 3).

^{a, b} Letras minúsculas diferentes, para contagem total de células ou contagem de esporos, apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Observa-se na Figura 7 a que as matrizes de condicionamento não afetaram a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células e contagem de esporos. Enquanto que, os meios de inoculação afetaram a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* (Figura 7 b). Nesse caso, a água inoculada com o *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea conferiu estatisticamente maior adesão média ao aço inoxidável (3,53 e 3,49 log UFC/cm², para contagem total de células e de esporos, respectivamente) quando comparada ao leite integral inoculado com esse *pool* de esporos, que apresentou adesão média de 2,84 e 2,72 log UFC/cm² para contagem total de células e de esporos, respectivamente. Observa-se ainda que, os valores encontrados para a contagem total de células (células vegetativas + esporos) e a contagem de esporos foram similares, sugerindo que a adesão e formação de biofilme foi proveniente da adesão dos esporos do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea que foram inoculados na água e no leite integral. Da mesma forma, Scott et al. (2007), observaram valores similares para contagem total de células e de esporos de micro-organismos termófilos em amostras de leite, sugerindo que as bactérias presentes nas amostras estavam predominantemente na forma de esporos.

Pode-se observar que a adesão de *B. cereus* aumentou significativamente ao longo do tempo uma vez que, este aumento foi, em média, de 0,76 log UFC/cm² entre 5 min (0,08h) e 72 h para contagem total de células e, de 0,65 log UFC/cm² para contagem de esporos (Figura 7 c). Observa-se ainda que houve um maior aumento inicial na adesão ao se comparar os valores entre 5 min e 10 h, e que a contagem de esporos mostrou que a adesão se estabilizou após 10 h de exposição. Essa estabilização era esperada, uma vez que esporos são estruturas dormentes (metabolicamente inativos) que não possuem a capacidade de multiplicação (BLACKBURN; McCLURE, 2009). Além do que, este fato pode indicar que a superfície do aço inoxidável não estava ainda completamente saturada com os esporos até 10 h de exposição conforme também observado por Wijman et al. (2007).

Com relação à contagem total de células, observou-se um aumento na adesão após 72 h quando comparada aos valores de 10 h, sugerindo que os esporos poderiam estar germinando, resultando assim em maiores valores para contagem total de células, pela consequente adesão de células vegetativas. Esses dados podem justificar a menor adesão de esporos após 48 h, uma vez que ocorreu um distanciamento nos valores de adesão entre a contagem total de células e de esporos após esse tempo de exposição (Figura 7 c).

O efeito da interação entre os meios de inoculação e o tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células e de esporos, é apresentado na Figura 8.

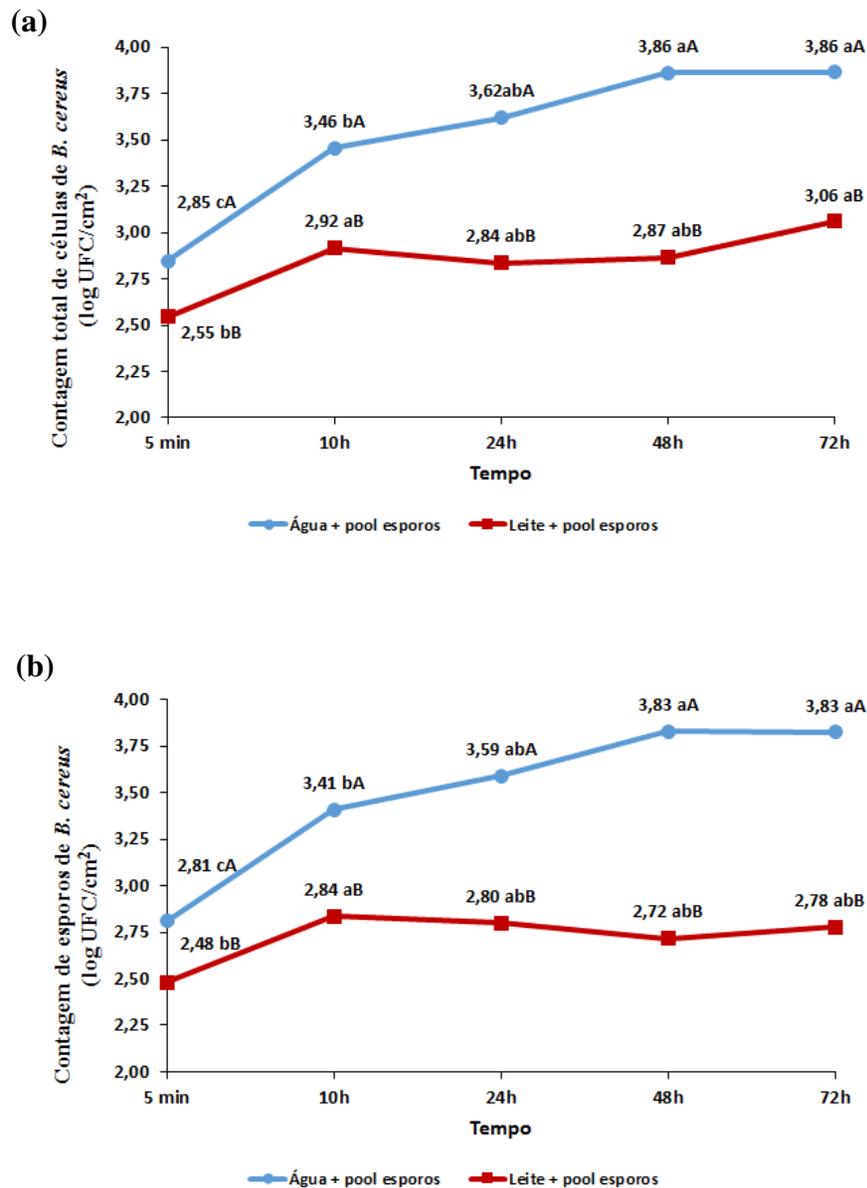


Figura 8. Efeito da interação entre os meios de inoculação e o tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, para (a) contagem total de células e (b) contagem de esporos, em log UFC/cm² (n=3).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes entre os meios de inoculação apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes ao longo do tempo de exposição apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se na Figura 8 que, independente das matrizes de condicionamento, o *pool* de esporos de *B. cereus* inoculado em água favoreceu significativamente a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, quando comparado ao *pool* de esporos de *B. cereus* inoculado em leite integral, em todos os tempos de exposição estudados. A adesão de *B. cereus* ao aço inoxidável quando foi inoculado em água também foi relatada por Nanasaki et al. (2010), que observaram que esporos de *Geobacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* apresentaram adesão ao aço inoxidável sem qualquer prévio condicionamento da superfície.

Pode-se observar que a adesão de *B. cereus* aumentou ao longo do tempo de exposição de forma diferente para os meios de inoculação, uma vez que houve um maior aumento de adesão de *B. cereus* ao aço inoxidável quando o *pool* de esporos foi inoculado em água do que quando inoculado em leite integral. Após 72 h, a contagem total de células (células vegetativas + esporos) aumentou ($p < 0,05$) 1,01 log UFC/cm² quando o *pool* de esporos de *B. cereus* foi inoculado em água e 0,51 log UFC/cm² quando inoculado em leite integral (Figura 8 a).

No que diz respeito à contagem de esporos (Figura 8 b), observou-se que a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* apresentou um aumento ($p < 0,05$) de 1,02 e 0,3 log UFC/cm² quando o *pool* de esporos de *B. cereus* foi inoculado em água e leite integral, respectivamente.

A menor adesão de *B. cereus* em aço inoxidável quando inoculado em leite integral pode ser explicada pela presença da gordura nessa matriz, a qual é hidrofóbica e, que pode ter interagido com a superfície hidrofóbica do aço inoxidável, competindo por sítios de ligação da superfície, assim com a bactéria (BARNES et al., 1999).

Com relação aos resultados apresentados na Figura 8, pode-se sugerir que ocorre germinação dos esporos que foram inoculados em leite integral, assim como mencionado anteriormente nos resultados apresentados na Figura 7 c. Essa observação pode ser melhor visualizada na Figura 9, que apresenta o desenvolvimento de adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliada por contagem total de células e de esporos, para os meios de inoculação ao longo do tempo de exposição.

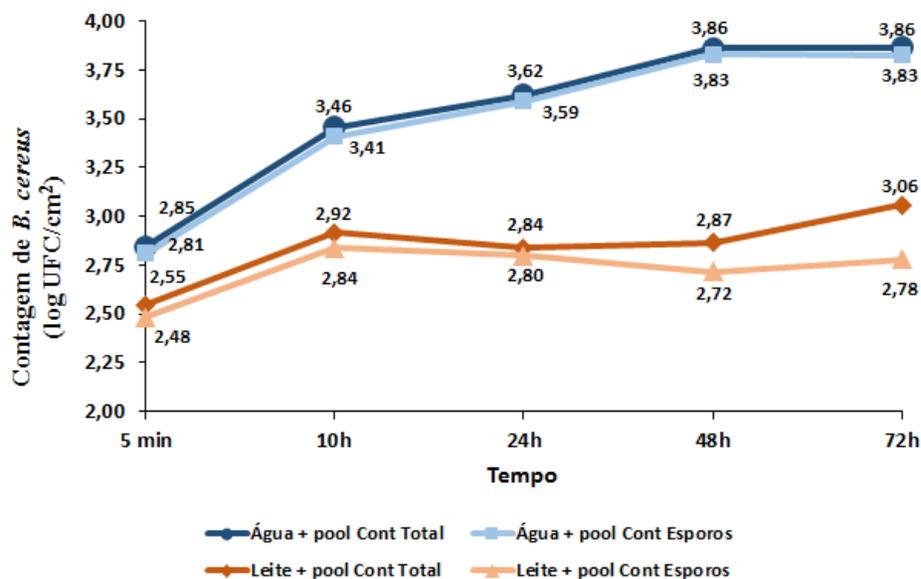


Figura 9. Desenvolvimento da adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliada por contagem total de células e contagem de esporos, expressas em log UFC/cm², para os meios de inoculação ao longo do tempo de exposição.

Observa-se na Figura 9, assim como foi observado na Figura 8, que a adesão de *B. cereus* ao aço inoxidável foi maior quando o *pool* dos esporos foi inoculado em água do que quando inoculado em leite integral. Pode-se observar ainda, que quando o *pool* de esporos foi inoculado em água, a contagem total de células (células vegetativas + esporos) e a contagem de esporos foram similares, sugerindo que a adesão em aço inoxidável nesse meio de inoculação ocorreu apenas por esporos, e que os mesmos não germinaram. Por outro lado, quando os esporos foram inoculados no leite integral, observou-se que a partir de 48 h a adesão de esporos de *B. cereus* diminuiu (contagem de esporos) e a contagem total de células aumentou, o que sugere também adesão de células vegetativas, indicando que o leite favoreceu a germinação dos esporos.

Esse fato indicou que após 48 h de exposição, provavelmente ocorreu germinação dos esporos, uma vez que os valores de contagem de esporos começaram a se distanciar dos valores de contagem total de células, como pode ser observado na Figura 9. Com relação à contagem total de células, que representa a contagem de células vegetativas e esporos, a adesão de *B. cereus* foi de 3,06 log UFC/cm² e, para a contagem de esporos de 2,78 log UFC/cm² após 72 h de exposição. Esses dados corroboram com os valores obtidos para o meio de inoculação (leite), que apresentou contagens de *B. cereus* de 5,67 log UFC/mL para

contagem total de células e 5,29 log UFC/mL para contagem de esporos, sugerindo novamente que o leite favoreceu a germinação dos esporos, provavelmente pelo contato dos esporos com os nutrientes presentes em sua composição.

A germinação dos esporos sugerida nesse estudo também foi observada por Shaheen et al. (2010), no qual relataram que esporos de *B. cereus* isolados de indústria láctea inoculados em leite integral foram capazes de formar biofilme e germinar após 48 h de exposição ao aço inoxidável. Além disso, os resultados obtidos que sugerem essa germinação corroboram com os dados apresentados na Figura 10, que apresenta o efeito da interação entre as matrizes de condicionamento e os meios de inoculação sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem de esporos.

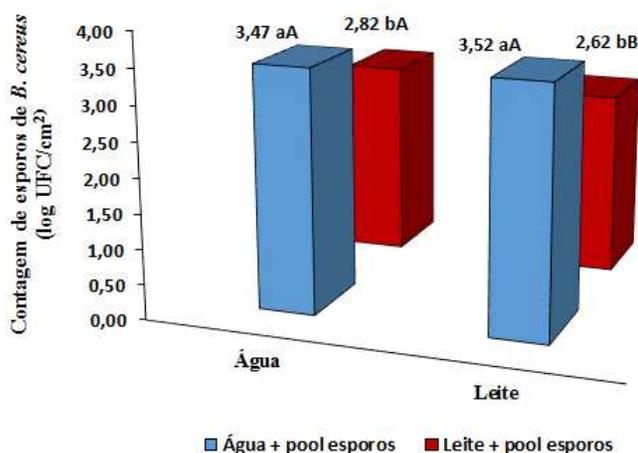


Figura 10. Efeito da interação entre as matrizes de condicionamento e os meios de inoculação sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem de esporos, em log UFC/cm² (n=3).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes entre as matrizes de condicionamento apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes entre os meios de inoculação apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com relação à contagem de esporos, observa-se maior adesão de *B. cereus* ao aço inoxidável após o condicionamento com água (2,82 log UFC/cm²) do que com leite integral (2,62 log UFC/cm²) (Figura 10). Esse resultado corrobora com o resultado apresentado anteriormente, no qual a camada condicionante com leite integral e seus constituintes pode ter favorecido a germinação dos esporos que foram inoculados no leite e, por isso a menor adesão foi observada nessa condição. Observa-se que a adesão e formação de biofilme por

B. cereus foi significativamente maior quando o *pool* de esporos de *B. cereus* foi inoculado em água do que em leite integral, em ambas as matrizes de condicionamento. Por outro lado, não foi observada diferença na adesão quando o *pool* de esporos de *B. cereus* foi inoculado em água após o condicionamento com as matrizes água (3,47 log UFC/cm²) e leite integral (3,52 log UFC/cm²).

O efeito da interação entre as matrizes de condicionamento e o tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, avaliado por contagem total de células, é apresentado na Figura 11.

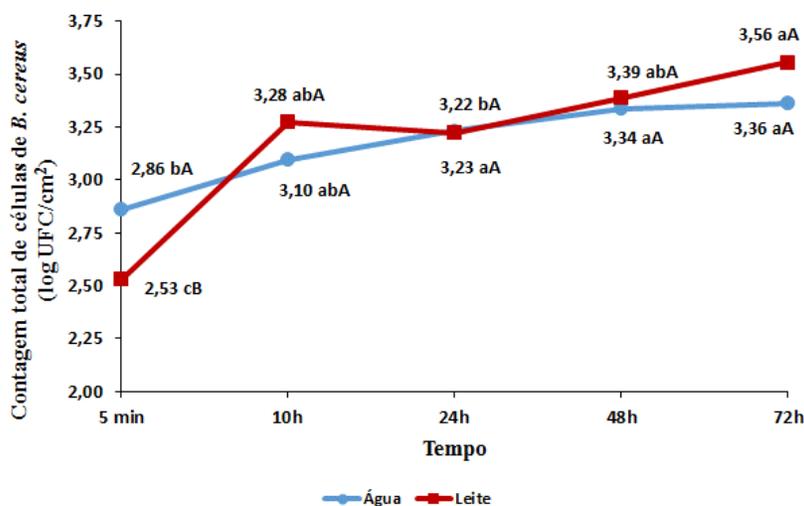


Figura 11. Efeito da interação entre as matrizes de condicionamento e o tempo de exposição sobre a adesão e formação de biofilme por *B. cereus*, para contagem total de células, em log UFC/cm² (n=3).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes entre as matrizes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes ao longo do tempo de exposição apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se na Figura 11 que o condicionamento do aço inoxidável com água favoreceu inicialmente (5 min) a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* (2,86 log UFC/cm²) quando comparada à adesão após o condicionamento com leite integral (2,53 log UFC/cm²). De acordo com Dickson; Koohmaraie (1989), o condicionamento da superfície de aço inoxidável pode alterar as propriedades físico-químicas da superfície, tais como cargas eletrostáticas, mudanças na hidrofobicidade e que podem afetar a ordem dos eventos

microbianos, conseqüentemente a adesão. Dessa forma, neste trabalho, esse fenômeno foi observado principalmente no início da formação do biofilme.

No que diz respeito aos outros tempos de exposição avaliados, a adesão foi a mesma para ambas as matrizes de condicionamento. Quando o aço inoxidável foi condicionado com água, independente dos meios de inoculação, a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* aumentou 0,5 log UFC/cm² entre 5 min (0,08h) e 72 h, cujos valores foram 2,86 log e 3,36 log UFC/cm², respectivamente. Enquanto que, independente dos meios de inoculação, a adesão e formação de biofilme por *B. cereus* aumentou 1,03 log UFC/cm² ao longo do tempo de exposição quando o aço inoxidável foi condicionado com leite integral.

Em resumo, os resultados apresentados nesta etapa indicaram que a adesão e formação de biofilme pelo *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea se estabilizou em torno de aproximadamente 10 h, não havendo um aumento significativo dessa adesão após esse tempo (Figura 7 c). Sendo assim, para a avaliação da eficiência dos procedimentos de higienização, selecionou-se os biofilmes formados após 24 h, uma vez que esse tempo é similar ao tempo de processamento encontrado no processamento de leite em pó (16 a 20 h), antes de um procedimento padrão de higienização CIP. Os quatro biofilmes avaliados foram os mesmos estudados na terceira etapa do trabalho, com duas matrizes de condicionamento do aço inoxidável (água e leite integral) e dois meios de inoculação do *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea (água e leite integral).

4.4 Avaliação de procedimentos de higienização na remoção de biofilmes de esporos de *B. cereus*

A Tabela 7 apresenta a adesão e formação de biofilme pelo *pool* de esporos de *B. cereus* após 24 h, avaliada por contagem de esporos, que foram utilizados na avaliação da eficiência dos procedimentos de higienização.

Tabela 7. Adesão e formação de biofilme pelo *pool* de esporos de *B. cereus* após 24 h, avaliada por contagem de esporos, em log UFC/cm² (n=3).

Biofilme	Procedimento para formação de biofilme	Contagem de esporos (log UFC/cm²)
Biofilme _{água/água}	Cupons condicionados em água (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em água inoculada com <i>pool</i> de esporos de <i>B. cereus</i> (200 rpm, 55 °C por 24 h)	3,62
Biofilme _{água/leite integral}	Cupons condicionados em água (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em leite integral inoculado com <i>pool</i> de esporos de <i>B. cereus</i> (200 rpm, 55 °C por 24 h)	2,73
Biofilme _{água/leite integral}	Cupons condicionados em leite integral (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em água inoculada com <i>pool</i> de esporos de <i>B. cereus</i> (200 rpm, 55 °C por 24 h)	3,59
Biofilme _{leite integral/leite integral}	Cupons condicionados em leite integral (200 rpm, 55 °C por 20 h), seguidos de imersão em leite integral inoculado com <i>pool</i> de esporos de <i>B. cereus</i> (200 rpm, 55 °C por 24 h)	2,63

O efeito dos nove procedimentos de limpeza e sanitização sobre a remoção dos biofilmes formados pelo *pool* de esporos de *B. cereus*, avaliado por contagem de esporos, é apresentado na Figura 12.

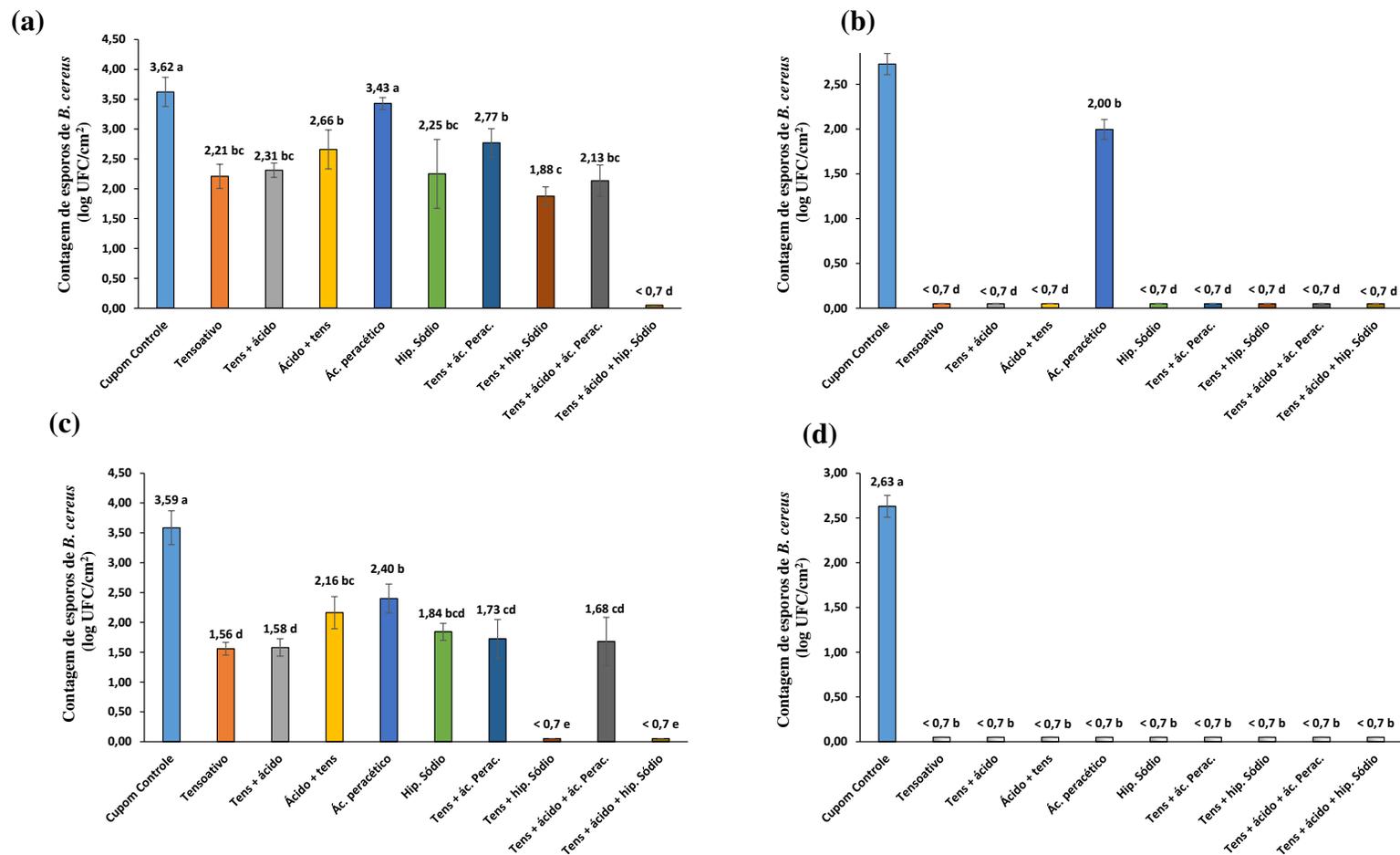


Figura 12. Efeito dos procedimentos de limpeza e sanitização sobre a remoção do (a) biofilme água/água, (b) biofilme água/leite integral, (c) biofilme leite integral/água, (d) biofilme leite integral/leite integral formados pelo pool de esporos de *B. cereus*, avaliado por contagem de esporos, em log UFC/cm² (n=3).

^{a,b} Para cada biofilme, letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); [§] Limite de detecção do método = 0,7 log UFC/cm². Desvio padrão não estabelecido.

Pode-se observar na Figura 12 que a utilização do CIP completo (detergente tensoativo aniônico e ácido), seguido de sanitização com hipoclorito de sódio, foi o único procedimento de higienização capaz de remover todos os biofilmes formados pelo *pool* de esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea. Por outro lado, observa-se que a eficiência dos outros procedimentos de higienização na remoção dos biofilmes apresentou diferenças na remoção ou redução das contagens de *B. cereus*.

Observa-se na Figura 12 a que todos os procedimentos, exceto o uso exclusivo do ácido peracético, reduziram as contagens de *B. cereus* presente no biofilme _{água/água}. O biofilme mostrou-se resistente a aplicação apenas do ácido peracético, uma vez que após esse procedimento a contagem de *B. cereus* (3,43 log UFC/cm²) não diferiu significativamente da contagem inicial do cupom controle (3,62 log UFC/cm²), que não foi submetido a nenhum procedimento de higienização. Enquanto que, a aplicação isolada do hipoclorito de sódio reduziu 1,37 log UFC/cm², apresentando contagem residual de *B. cereus* de 2,25 log UFC/cm².

Somente o uso de um CIP completo, utilizando hipoclorito de sódio como sanitizante, resultou na remoção total desse biofilme, com contagens residuais de *B. cereus* nas superfícies de aço inoxidável abaixo do limite de detecção do método (< 0,7 log UFC/cm²). Por outro lado, esse biofilme mostrou-se resistente ao CIP completo seguido de sanitização com ácido peracético, com redução de apenas 1,49 log UFC/cm² da população de *B. cereus*. Em geral, os resultados mostram que apenas um dos nove procedimentos utilizados no estudo foi eficiente na remoção total desse biofilme, o que indica que se os outros procedimentos forem utilizados na tentativa de remoção, os micro-organismos ainda estarão presentes e, podem aderir a outras superfícies e formarem novos biofilmes (Figura 12 a). Possivelmente os apêndices celulares (esporos) e as interações hidrofóbicas (superfície e esporo) que provavelmente governaram essa adesão, eram fortes e contribuíram para a maior resistência desse biofilme aos procedimentos de higienização.

No que diz respeito ao biofilme _{água/leite integral}, a sanitização com uso exclusivo do ácido peracético foi o único procedimento que não foi eficiente na remoção total do biofilme, apresentando contagem de *B. cereus* de 2,00 log UFC/cm² (Figura 12 b). Assim como no biofilme _{água/água}, o ácido peracético foi o procedimento menos eficiente na remoção do biofilme e, os demais procedimentos de higienização promoveram a redução das contagens de *B. cereus* para níveis não detectáveis (< 0,7 log UFC/cm²). Acredita-se que as interações

que mantinham os esporos aderidos à esse biofilme eram mais fracas que as interações presentes no biofilme anterior, o que também pode ser comprovado pela menor adesão dos esporos de *B. cereus* no cupom controle (2,73 log UFC/cm²) quando comparado à adesão no biofilme água/água que foi de 3,62 log UFC/cm².

Com relação ao biofilme leite integral/água, dois procedimentos de higienização foram capazes de remover completamente o biofilme, apresentando contagens residuais nas superfícies de aço inoxidável abaixo do limite de detecção do método (< 0,7 log UFC/cm²), sendo o procedimento de limpeza com detergente tensoativo aniônico, seguido de sanitização com hipoclorito de sódio e o procedimento CIP completo com o uso do hipoclorito de sódio (Figura 12 c). Os demais procedimentos de limpeza e sanitização utilizados não foram eficientes na remoção total desse biofilme, entretanto, reduziram as contagens de *B. cereus*. Os procedimentos que conferiram maior redução nas contagens foram a limpeza com detergente tensoativo aniônico e com tensoativo aniônico seguido de detergente ácido, uma vez que reduziram as contagens de *B. cereus* para 1,56 e 1,58 log UFC/cm², respectivamente. A aplicação do sanitizante ácido peracético reduziu a contagem de *B. cereus* para 2,40 log UFC/cm², sendo o procedimento que apresentou menor redução na contagem do micro-organismo. Acredita-se que a condição do biofilme leite integral/água apresentava interações mais fortes que mantinham os esporos aderidos à esse biofilme, por meio principalmente das interações hidrofóbicas, o que pode ser explicado pela maior resistência desse biofilme aos agentes de higienização.

Assim como observado nos dois biofilmes anteriores, a aplicação isolada do sanitizante ácido peracético não foi suficiente para remover o biofilme, sendo também o que conferiu menor redução nas contagens de *B. cereus* conforme apresentado anteriormente nos resultados do biofilme água/água e do biofilme água/leite integral.

Pode-se observar na Figura 12 d que todos os procedimentos de limpeza e sanitização foram eficientes na remoção do biofilme leite integral/leite integral, que apresentou contagens residuais de *B. cereus* nas superfícies de aço inoxidável abaixo do limite de detecção do método (< 0,7 log UFC/cm²). Uma possível explicação é que esse biofilme não estava completamente maduro, o que pode ter facilitado a ação dos detergentes e sanitizantes sobre os biofilmes, que são removidos com mais facilidade (SREY; JAHID; HA, 2013). Tem sido relatado que uma mesma espécie de micro-organismo pode formar diferentes biofilmes e com diferentes graus de maturidade, o que depende de diversos fatores como as condições

do meio, presença ou não de nutrientes, mudanças nas interações eletrostáticas. A presença de leite no meio de cultivo e como filme condicionante pode ter alterado as propriedades físico-químicas da interação superfície/espore, sugerindo a presença de uma fraca adesão para esse biofilme (DICKSON; KOOHMARAIE, 1989).

Neste caso, o procedimento de limpeza por meio do detergente tensoativo aniônico foi capaz de remover os constituintes do leite integral (gorduras, proteínas e carboidratos), além do detergente ácido que possui a capacidade de solubilizar os minerais envolvidos na interação biofilme-superfície ou de romper ligações, promovendo a liberação das células remanescentes fortemente aderidas à superfície do aço inoxidável (FERNANDES; KABUKI; KUAYE, 2015). Outra explicação é que a utilização da temperatura de 40 °C (ação térmica) e agitação (340 rpm) que simula a aplicação de energia mecânica na superfície foram utilizadas em combinação com os detergentes (ação química), auxiliando assim a eficiência do processo de limpeza (FORSYTHE, 2013). A ação mecânica e química tem um efeito sinérgico, sendo que ambos desempenham importante papel na remoção da célula aderida e do biofilme (SREY; JAHID; HA, 2013).

Quando houve apenas aplicação dos sanitizantes, à temperatura ambiente, pode-se sugerir que a utilização de ação mecânica (340 rpm) juntamente com a ação antimicrobiana dos sanitizantes foram suficientes, neste caso, para remover completamente o biofilme. Sendo assim, as células que estavam fracamente aderidas ou envoltas na matriz do biofilme foram liberadas, levando à diminuição das contagens dos micro-organismos (FISHER; PHILLIPS, 2009).

De acordo com Hinton et al. (2002), durante a produção de leite em pó, os micro-organismos estão aderindo e sendo removidos ao mesmo tempo das superfícies dos equipamentos. Resultados diferentes desse trabalho foram observados por esses autores que constataram que a limpeza de uma superfície de aço inoxidável com NaOH 2% (p/v) à 65 °C não inativou *Geobacillus stearothermophilus* que estava aprisionado na matriz láctea, além de que, uma vez que o *fouling* é removido pelo detergente, a bactéria ali presente pode recontaminar o próximo produto que será processado. Rosmaninho et al. (2007), após simular a formação de um filme condicionante com leite integral em aço inoxidável, observou que a adesão de esporos de *B. cereus* apresentou contagens de $1,43 \times 10^4$ UFC/cm² e, que após um procedimento CIP utilizando NaOH 0,5% (p/v) à 60 °C, o número de esporos residuais

aderidos nas superfícies foi de aproximadamente $1,5 \times 10^1$ UFC/cm², indicando a resistência desse biofilme .

De modo geral, nesse estudo, o hipoclorito de sódio foi o sanitizante mais eficiente, removendo o biofilme *água/leite integral* e o biofilme *leite integral/leite integral*, quando aplicado sem qualquer outro procedimento complementar. Sua eficiência foi maior quando se utilizou um tratamento de limpeza anterior, no caso o uso do detergente tensoativo aniônico seguido do detergente ácido, contribuindo para que este fosse o único procedimento de limpeza e sanitização dos nove testados que foi capaz de remover totalmente todos os biofilmes estudados no trabalho, a níveis de contagem de esporos de *B. cereus* abaixo do limite de detecção do método ($< 0,7 \log$ UFC/cm²).

O mecanismo de inativação de esporos de *B. subtilis* por meio da utilização de hipoclorito de sódio ou dióxido de cloro foi atribuído ao dano causado na membrana interna dos esporos, resultando assim na inibição da sua germinação (YOUNG; SETLOW, 2003).

Esses resultados são diferentes dos encontrados por Fernandes (2014), no qual o sanitizante ácido peracético foi mais eficiente quando comparado ao hipoclorito de sódio na remoção de biofilme multi-espécie de *B. cereus* e *Enterococcus* spp. Vale ressaltar que diferentes cepas, contagem inicial dos micro-organismos aderidos, diferentes matrizes e condições de formação dos biofilmes, diferentes métodos de higienização dificultam a comparação de estudos.

Em resumo, o biofilme *água/água* foi o que apresentou maior resistência à maioria dos procedimentos de limpeza e sanitização testados neste trabalho, o que indica uma grande preocupação da indústria, principalmente com a água que será utilizada posteriormente na limpeza dos equipamentos. Os esporos aderidos ao aço inoxidável nestas condições se mostraram resistentes à higienização e fortemente aderidos ao aço inoxidável. Oliver; Jayarao; Almeida (2005) relataram que as superfícies dos equipamentos podem ser uma fonte de contaminação para micro-organismos deteriorantes e patogênicos, no entanto, essa contaminação também pode ser proveniente da água utilizada para a higienização dessas superfícies encontradas nas plantas de processamento de produtos lácteos.

Ao avaliar os resultados, observou-se que a maior eficiência dos procedimentos de higienização ocorreu quando utilizou-se o leite como meio de inoculação (biofilme *água/leite integral* e biofilme *leite integral/leite integral*). Acredita-se que a interação do esporo com a matriz láctea presente no meio de cultivo, principalmente por meio de interações hidrofóbicas, contribuiu

para a menor adesão dos esporos no cupom controle, sugerindo interações de adesão fracas e que foram mais facilmente eliminadas por meio dos procedimentos de higienização. Isso indica que quando os esporos foram inoculados em água (biofilme *água/água* e biofilme *leite integral/água*) os mesmos aderiram mais fortemente as superfícies, contribuindo para a maior resistência aos procedimentos de higienização. A maior resistência pode ser explicada pelo caráter hidrofílico da água e hidrofóbico do esporo, que naturalmente se repelem, sugerindo maior adesão do esporo ao aço inoxidável, que também é hidrofóbico.

Os resultados encontrados no trabalho são preocupantes (valores de adesão de *B. cereus* reportados em log UFC/cm²) uma vez que, ao se pensar na área total de equipamentos utilizados no processamento de leite e produtos lácteos, esse número se torna um valor crítico para a contaminação dessas superfícies, pois o desprendimento das células de *B. cereus* poderá prejudicar a segurança microbiológica, além de afetar a qualidade do produto. Bremer et al. (2009) relataram que trocadores de calor à placas, incluindo pasteurizadores e seções de evaporadores estão entre as áreas mais críticas para formação de biofilme uma vez que compreendem uma grande área superficial.

Com relação a esse estudo, resultados similares foram observados por Wirtanen et al. (1996), no qual após um procedimento CIP com detergente alcalino e ácido, esporos de *B. cereus* NCTC 2599 apresentaram maiores contagens residuais nas superfícies de aço inoxidável sem condicionamento quando comparado às contagens em aço inoxidável previamente condicionado com leite. A mesma tendência foi observada por Faille; Fontaine; Bénézec (2001), que observaram que esporos de *B. cereus*, isolados do processamento de produtos lácteos e resuspenso em solução salina apresentaram adesão em torno de 6,5 log UFC/cm², e após o procedimento CIP utilizando um detergente alcalino comercial 1% (v/v) à 50 °C, as contagens reduziram 1 log aproximadamente, resultando em valores próximos a 5,5 log UFC/cm² de esporos remanescentes. Esses resultados são similares ao encontrados para a remoção do biofilme *água/água*, o qual se mostrou extremamente resistente à diferentes procedimentos de higienização.

Shaheen et al. (2010), relataram que a adesão de esporos aos equipamentos de aço inoxidável encontrados em indústrias lácteas pode representar um mecanismo para a sua sobrevivência, pois a forte adesão seria uma vantagem ao pensar que os esporos poderiam se espalhar através da água utilizada na indústria. Acredita-se também que as condições utilizadas em um procedimento CIP afetariam as propriedades dos esporos e portanto

poderiam modificar sua habilidade em aderir novamente ao aço inoxidável após seu desprendimento dos biofilmes (FAILLE et al., 2010a).

Os danos causados à superfície dos esporos, principalmente por altas temperaturas utilizadas no processo de limpeza podem modificar suas propriedades físico-químicas, tais como hidrofobicidade, que pode apresentar um papel na adesão de esporos ao aço inoxidável (FAILLE et al., 2002).

Esporos de *Geobacillus* sp. após tratamento com NaOH 1% (p/v) foram seis vezes mais hidrofóbicos e apresentaram significativamente maior habilidade de adesão em aço inoxidável quando comparados à esporos que não sofreram esse tratamento. A maior hidrofobicidade desses esporos foi relacionada à hidrólise parcial da capa do esporo devido à ação do NaOH que contribuiu para a liberação de mais grupos hidrofóbicos presentes dentro da capa do esporo, conforme os autores observaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão (SEALE et al., 2010). Faille et al. (2002) observaram que esporos hidrofóbicos de *B. cereus* aderiram em maior quantidade e apresentaram maior resistência aos procedimentos de limpeza com detergente alcalino quando comparados à esporos de *B. subtilis*.

Os agentes tensoativos diminuem a tensão superficial da água auxiliando o contato entre os resíduos e os agentes de limpeza, além de contribuir para o enfraquecimento das ligações formadas entre a superfície e o resíduo (SALUSTIANO et al., 2010). No caso deste trabalho, provavelmente o detergente tensoativo aniônico não foi suficiente para desempenhar seu papel na remoção dos esporos que não estavam protegidos pela matriz láctea. Acredita-se que o detergente pode ter desempenhado essa função quando os esporos foram inoculados na matriz láctea, agindo principalmente no enfraquecimento das ligações formadas pelas proteínas e na emulsificação da gordura presentes no leite e, conseqüentemente os esporos foram removidos juntamente com essa matriz, por sua vez, o mesmo desempenho não foi observado quando os esporos foram inoculados na água.

Um estudo comparando os efeitos dos sanitizantes utilizando os compostos ativos de NaOCl, HCl, H₂O₂, ácido acético e amônio quaternário, Black et al (2008) concluiu que compostos contendo hipoclorito foram mais efetivos contra esporos de *B. cereus*, e produtos contendo derivados de HCl e H₂O₂ reduziram significativamente o número de esporos embora em menor taxa. A maioria dos sanitizantes com princípio ativo de NaOCl reduziram os esporos à níveis sensíveis em 10 min à 25 °C.

A utilização apenas de hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm por 10 min e 300 ppm por 5 min foi capaz de eliminar *B. cereus* ($< 0,70 \log$ UFC/cupom) que estava presente em biofilme em aço inoxidável. Após a remoção da matriz do biofilme por procedimento de limpeza, *B. cereus* foi eliminado após tratamentos com 100 ppm por 10min, 200 ppm por 5 min e 300 ppm por 3 min, sugerindo a maior eficiência do hipoclorito de sódio após um procedimento de limpeza (LEE et al., 2010).

Assim como observado nesse estudo, o ácido peracético foi menos eficiente em inativar ou remover esporos de *B. cereus* presentes em biofilme formado em aço inoxidável contendo caldo TSB quando comparado ao hipoclorito de sódio (RYU; BEUCHAT, 2005). Sugere-se que a ineficiência do ácido peracético em alguns biofilmes está relacionada ao fato dos aldeídos não degradarem o biofilme, sendo capazes de até estabilizar o mesmo (SREY; JAHID; HA, 2013).

Bactérias podem sobreviver e produzir biofilmes em superfícies de aço inoxidável mesmo após a higienização por meio do sistema CIP (SHI; ZHU, 2009). Este fato pode ser atribuído ao uso indevido de agentes antimicrobianos utilizados no controle de biofilmes, uma vez que não existem métodos quantitativos padronizados para a seleção de protocolos eficientes no controle de biofilmes (LEMOS et al., 2015).

Conforme mencionado anteriormente, esporos de *B. cereus* são mais hidrofóbicos do que esporos de outros *Bacillus* spp., tornando mais difícil sua remoção de equipamentos durante o processo de limpeza (GRANUM; LUND, 1997). Além disso, Shaheen et al. (2010) observaram que esporos de *B. cereus* recuperados de um silo de leite após limpeza alcalina foram capazes de germinar e formar biofilme, mostrando sua elevada resistência.

A eficiência da remoção dos esporos durante os procedimentos de limpeza e sanitização é altamente influenciada pela susceptibilidade da superfície dos esporos aos agentes químicos, que podem enfraquecer a interação entre os esporos e a superfície ao longo do tempo (FAILLE et al., 2013).

A resistência de biofilmes à agentes antimicrobianos, tais como sanitizantes, tem sido atribuída ao controle ineficiente dos biofilmes por meio de processos de higienização convencionais (MALEK, 2012). A elevada resistência das células presentes em biofilme pode ser explicada pela baixa difusão dos agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme, dificultando assim o alcance das camadas mais profundas do biofilme. Acredita-se

que a taxa de difusão dos agentes químicos através das camadas do biofilme pode ser de 60 a 80% menor (KRÓLASIK et al., 2010).

De qualquer forma, procedimentos tais como limpeza e sanitização são indispensáveis para a redução dos micro-organismos à níveis aceitáveis (SREY; JAHID; HA, 2013).

4.5 Características físico-químicas da superfície dos esporos

4.5.1 Potencial Zeta

A Figura 13 apresenta os valores de potenciais zeta (mV) em função do pH das suspensões dos esporos de *B. cereus* utilizadas nos testes de adesão e formação de biofilme e a Tabela 7 apresenta o ponto isoelétrico desses esporos.

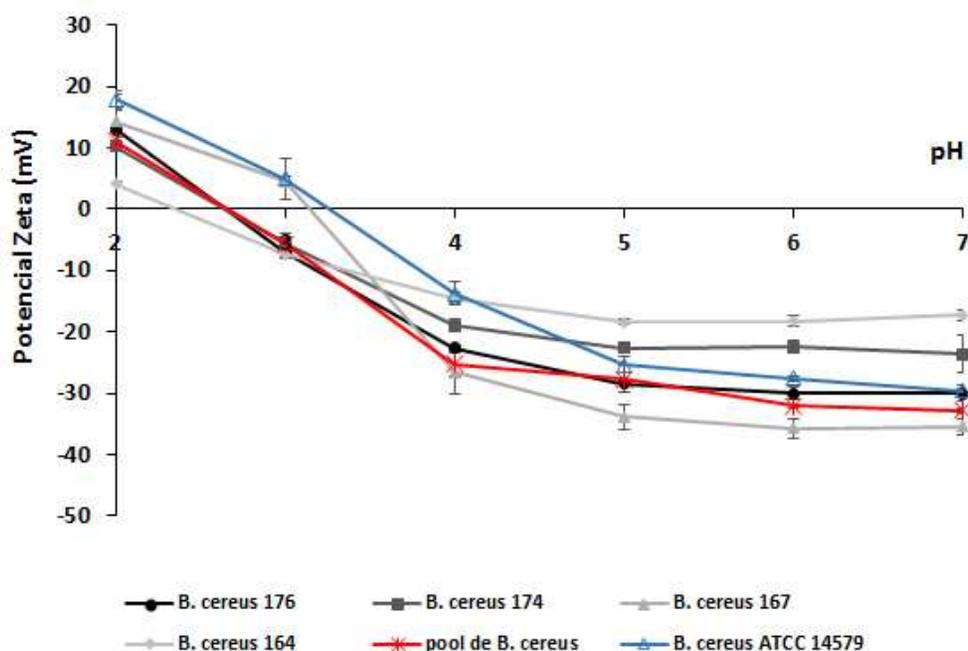


Figura 13. Potenciais zeta das suspensões de esporos de *B. cereus* em função da faixa de pH de 2 a 7.

Valores representam a média de duas replicatas e a barra de erros representa o desvio padrão das médias.

Tabela 7. Ponto isoelétrico das suspensões de esporos de *B. cereus* (n=2).

Cepas	Ponto Isoelétrico (pH)
<i>B. cereus</i> 176	2,75 ± 0,01
<i>B. cereus</i> 174	2,78 ± 0,03
<i>B. cereus</i> 167	3,25 ± 0,00
<i>B. cereus</i> 164	2,47 ± 0,03
Pool de <i>B. cereus</i>	2,79 ± 0,08
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	3,38 ± 0,08

Pode-se observar na Figura 16 que todas as cepas apresentaram um decréscimo no potencial zeta (mV) com um aumento do pH, o que indica que a carga da superfície da bactéria é altamente dependente do pH. O pH no qual o valor do potencial zeta é zero é definido como o ponto isoelétrico da célula (KARUNAKARAN; BIGGS, 2011). As cepas apresentaram carga negativa em uma ampla faixa de pH e no geral, apresentaram ponto isoelétrico similares, com pH variando de 2,5 a 3,5, como pode ser observado na Tabela 7.

Resultados similares foram encontrados por Seale et al. (2008) no qual esporos de *Geobacillus* spp. apresentaram valores de potencial zeta negativos em ampla faixa de pH, com ponto isoelétrico variando entre pH 3,0 e 4,0.

A maioria das bactérias possuem em sua superfície cargas negativas, uma vez que podem se originar dos lipopolissacarídeos do envelope celular e/ou dos grupamentos funcionais ácidos das proteínas presentes na pili (BAYER e SLOYER, 1990). O pH do meio em que se encontra a bactéria controla a protonação e a desprotonação dos grupos funcionais de superfície e, portanto, a carga da superfície celular pode variar de acordo com o pH (MARSHALL, 1976).

O ponto isoelétrico de ácidos carboxílicos associados à proteínas encontra-se na faixa de pH 4,0 e 5,0, enquanto que o ponto isoelétrico dos ácidos carboxílicos associados aos polissacarídeos é mais próximo de pH 3,0 (SEALE et al., 2010). O ponto isoelétrico da cepa

ATCC 14579 encontrado neste trabalho foi de 3,38 e apresentou resultados similares aos encontrados por Karunakaran; Biggs (2011) para esta mesma cepa que apresentou ponto isoelétrico de 3,4.

A carga da superfície celular está frequentemente associada à adesão das bactérias às superfícies (UKUKU; FETT, 2002; KARUNAKARAN; BIGGS; 2011). Superfícies como o aço inoxidável normalmente possuem carga negativa em pH neutro, o que naturalmente resulta na repulsão de células carregadas negativamente (HERMANSSON, 1999). Os íons presentes no meio de cultivo podem se adsorver à superfície do aço inoxidável, alterando assim a carga elétrica do mesmo. Os meios de cultivo utilizados neste estudo apresentaram, em geral, valores de pH que variaram de 5,9 a 6,7, o que indica que os esporos possuíam carga negativa no momento da adesão, sugerindo também que o aço inoxidável apresentava carga negativa.

As superfícies das células bacterianas e/ou esporos podem possuir domínios com cargas carregadas positivamente que podem mediar a adesão apesar da repulsão eletrostática, além de que outras propriedades físico-químicas como hidrofobicidade, forças de Van der Waals e forças estéricas podem superar as interações eletrostáticas no processo de adesão (PALMER et al., 2010). De acordo com Daniels; Vanderleyden; Michiels (2004), a presença de flagelos pode superar as forças repulsivas presentes nas superfícies do substrato e, assim favorecer a formação de uma camada de células na superfície do material.

Para os esporos de *B. cereus*, a adesão pode ser explicada pela presença de apêndices em sua superfície que tem a função de mediar principalmente a adesão inicial dos esporos à superfície do material. Esses apêndices foram visualizados por meio de microscopia eletrônica de transmissão por diversos autores (FAILLE et al., 2002; FAILLE et al., 2010b; ANKOLEKAR; LABBÉ, 2010). Segundo Houry et al. (2010), a adesão de *B. cereus* às superfícies é altamente influenciada pela carga de superfície celular e presença de flagelos.

4.5.2. Hidrofobicidade

A Figura 14 apresenta a porcentagem de hidrofobicidade das suspensões de esporos de *B. cereus* utilizadas neste trabalho na adesão e formação de biofilme.

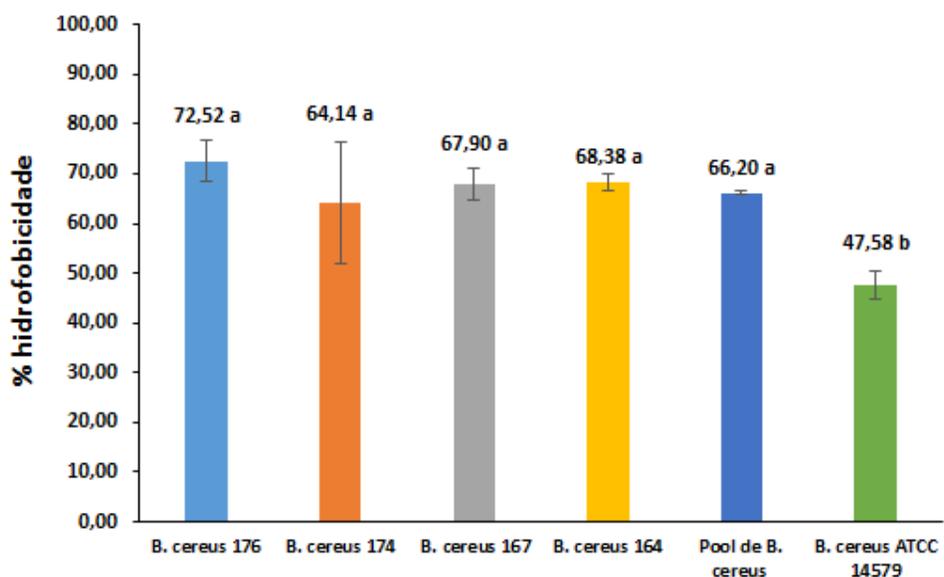


Figura 14. Porcentagem de hidrofobicidade das suspensões de esporos de *B. cereus*.

^{a,b} Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pode-se observar na Figura 17 que, os esporos das cepas que foram isoladas do ambiente de processamento de produtos lácteos apresentaram altos valores de hidrofobicidade. De acordo com Karunakaran; Biggs, (2011) para uma bactéria ser considerada hidrofóbica, o valor de hidrofobicidade deve ser igual ou maior que 50% e, desta forma, a cepa ATCC 14579 estava perto do limite entre ser considerada hidrofóbica ou não, uma vez que apresentou valor de 47,58%.

Esse resultado sugere que esse menor valor para os esporos de *B. cereus* da cepa ATCC 14579 pode estar relacionado à menor adesão dos mesmos nas duas primeiras etapas do trabalho, quando comparada à adesão dos esporos do *pool de B. cereus* isolados da indústria láctea. Faille et al. (2002) também mostraram que esporos de *B. cereus* isolados do processamento de indústrias lácteas apresentaram altos valores para hidrofobicidade (87%).

Resultados similares foram obtidos por Elhariry (2011), que observou que os esporos da cepa de referência *B. cereus* DSMZ 345 apresentaram significativamente menor hidrofobicidade quando comparados aos esporos de *B. cereus* isolados de água. O autor relatou que a maior hidrofobicidade de micro-organismos isolados quando comparados à cepa de referência pode estar relacionada à sua exposição a condições adversas, que podem levar a alterações nas propriedades de superfície das bactérias e, sugeriu que ao simular

condições de biofilme, o melhor é utilizar isolados e não cepas de referência para uma representação mais real das situações encontradas. Nesse mesmo estudo, a maior adesão dos esporos em superfície de poliestireno foi atribuída à alta hidrofobicidade dos mesmos quando comparados às células vegetativas.

Interações hidrofóbicas apresentam um importante papel na adesão de bactérias às superfícies, principalmente com relação a esporos de *Bacillus* sp. (GILBERT et al., 1991; LIU et al., 2004). A alta hidrofobicidade da superfície de uma bactéria pode auxiliar na adesão à superfície de diferentes materiais e, no caso da superfície bacteriana e a superfície do material serem mais hidrofóbicas que a fase aquosa (meio de cultivo), isso pode indicar um aumento na interação hidrofóbica entre a bactéria e o substrato pois facilita a remoção do filme de água existente entre as duas interfaces (LIU et al., 2004).

As interações hidrofóbicas são consideradas as mais fortes dentre as interações não covalentes, o que pode sugerir que durante a adesão ao aço inoxidável, os esporos apresentarão maior adesão quando comparados às células vegetativas (HARIMAWAN et al., 2013). A forte adesão de *B. cereus* tem sido atribuída ao caráter hidrofóbico do exospório que pode estar presente em algumas cepas (HUSMARK; RÖNNER, 1990; FAILLE et al., 2002; FAILLE et al., 2010b; ANKOLEKAR; LABBÉ, 2010).

De acordo com Seale et al. (2008), as superfícies dos esporos são heterogêneas e contém uma combinação de grupos funcionais tais como carboxilas, amins e grupos fosfatos, que podem contribuir para a variação encontrada entre os testes utilizados para avaliar a hidrofobicidade de um micro-organismo, dificultando assim a comparação de resultados.

Pode-se observar que os dados obtidos com relação às características de superfície dos esporos demonstram a importância de avaliar diversos fatores, tais como a hidrofobicidade e a carga elétrica, para o entendimento da habilidade de adesão e formação de biofilme por micro-organismos. Sendo assim, as propriedades de superfície de *B. cereus*, tais como o potencial zeta e a hidrofobicidade avaliadas neste trabalho, além da presença do exospório e apêndices relatados na literatura, podem contribuir para a persistência de *B. cereus* nas superfícies de equipamentos, contribuindo assim para a adesão e formação de biofilme.

5. CONCLUSÕES

- Os esporos do *pool* de *B. cereus* isolados da indústria láctea apresentaram maior adesão ao aço inoxidável quando comparados aos esporos da cepa de referência de *B. cereus* ATCC 14579, o que pode ser atribuído às características físico-químicas da superfície dos esporos, uma vez que os esporos de *B. cereus* isolados da indústria láctea apresentaram alta valor para hidrofobicidade. O condicionamento do aço inoxidável com leite integral favoreceu significativamente a adesão desses esporos inoculados em água quando comparados ao não condicionamento do aço inoxidável.
- O tempo de exposição dos cupons aos meios de inoculação contendo um *pool* de esporos de *B. cereus* afetou significativamente a adesão desse micro-organismo ao aço inoxidável, sendo que, após aproximadamente 10 h ocorreu uma estabilização do biofilme. Quando os esporos foram inoculados em água houve maior adesão quando comparados à inoculação em leite integral, independente das matrizes de condicionamento do aço inoxidável, possivelmente devido as interações hidrofóbicas mais fortes.
- Todos os procedimentos de higienização foram eficientes na remoção do biofilme que foi formado por meio do condicionamento do aço inoxidável com leite integral, seguido por inoculação do *pool* de esporos de *B. cereus* em leite integral. O sanitizante hipoclorito de sódio foi significativamente o mais eficiente em comparação ao ácido peracético na remoção de todos os biofilmes. Além disso sua associação com prévia limpeza com detergente tensoativo aniônico e ácido, aumentou a sua eficiência, reduzindo as contagens de *B. cereus* a níveis não detectáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMOU, F.; POQUOT, M.; THONART, P.; ROUXHET PG. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p. 119–126, 2001.

ALASRI, A.; ROQUES, C.; MICHEL, G.; CABASSUD, C.; APTEL, P. Bacterial properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n.7, p.635-642, 1992.

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

ANDRADE, N. J.; 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. 7, p. 833-838, 1998.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, p. 15-66, 2008 a.

ANDRADE N.J.; PINTO, C.L.O; ROSADO, M.S. Controle da Higienização na Indústria de Alimentos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, p. 185-230, 2008 b.

ANKOLEKAR, C.; LABBÉ, R. G. Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 982–984, 2010.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Washington, 2006.

ARAÚJO, E.A.; ANDRADE, N.J.; CARVALHO, A.F.; RAMOS, A.M.; SILVA, C.A.S. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.

BANYKÓ, J.; VYLETĚLOVÁ, M. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 318–323, 2009.

BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, a H. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4543–4548, 1999.

- BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B. M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v. 25, p. 588–596, 2008.
- BASSLER, B. L. Small talk. Cell–to-cell communication in bacteria. **Cell**, v. 109, p. 421–424, 2002.
- BATT, C. *Bacillus cereus*. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**, London: Academic Press, p. 119-124, 1999.
- BAYER, M. E.; SLOYER, J.L. The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis, **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 867-874, 1990.
- BELTRAME, C. A.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A.; ROTTAVA, I.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D. De; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 228–232, 2012.
- BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERREIRA, S. O.; SÁ, J. P. N.; ARAÚJO, E. A.; DELATORRE, D. M. Z.; LUIZ, L. M. P. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 984-992, 2010.
- BERNARDES, P.C.; ARAÚJO, E.A.; PIRES, A.C.S.; JUNIOR, J.F.Q.F.; LELIS, C.A.; ANDRADE, N.J. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1261-1268, 2012.
- BLACK, D. G.; TAYLOR, T. M.; KERR, H. J.; PADHI, S.; MONTVILLE, T. J.; DAVIDSON, P. M. Decontamination of fluid milk containing *Bacillus* spores using commercial household products. **Journal Food Protection**, v. 71, n. 3, p. 473-478, 2008.
- BLACKBURN, C.W.; McCLURE, P.J. Pathogenic *Bacillus* species. In: **Foodborne pathogens – hazards, risk analysis and control**. Second edition. CRC Press. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Granta Park, Cambridge, UK, p. 844-888, 2009
- BLEL, W.; LEGENTILHOMME, P.; LEGRAND, J.; BÉNÉZECH, T.; GENTIL-LELIÈVRE, C.L. Hygienic design: effect of hydrodynamics on the cleanability of a food processing line. **AIChE Journal**, v. 54, n.10, p. 2553–2566, 2008.
- BLOOMFIELD, S.; ARTHUR, M. Comparative testing of disinfectants using proposed European surface test methods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, p. 119–125, 1993.
- BORE, E.; LANGSRUD, S. Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 96–105, 2005.

BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. a. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 152–157, 1996.

BRASIL. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT (UHT)**. Anexo XI - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. In **Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2001.

BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, a. J. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 254–262, 2006.

BREMER, P. J.; SEALE, B.; FLINT, S.; PALMER, J. Biofilms in dairy processing. In: FRATAMICO, P. M.; ANNOUS, B. A.; GUNTHER, N. W. **Biofilms in the food and beverage industries**. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited. p 396–431, 2009.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, p. 1017–1032, 2011.

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

BRYERS, J.; RATNER, B. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, v. 70, n. 5, p. 232–237, 2004.

BURGESS, S. A.; BROOKS, J. D.; RAKONJAC, J.; WALKER, K. M.; FLINT, S. H. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 1012–1018, 2009.

CABEÇA, T. K., PIZZOLITTO, A. C., PIZZOLITTO, E. L. Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 121-125, 2006.

CARLIN, F.; BRILLARD, J.; BROUSSOLLE, V.; CLAVEL, T.; DUPORT, C.; JOBIN, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; SOROKINE, A.; NGUYEN-THÉ, C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Research International**, v. 43, p. 1885–1894, 2010.

- CHITOV, T.; DISPAN, R.; KASINRERK, W. Incidence and diarrhegenic potential of *Bacillus cereus* in pasteurized milk and cereal products in Thailand. **Journal of Food Safety**, v. 28, p. 467–481, 2008.
- DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 261-289, 2004.
- DAT, N. M.; HAMANAKA, D.; TANAKA, F.; UCHINO, T. Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk solutions at different pH values and its effect on bacterial adherence. **Food Control**, v. 21, n. 12, p. 1769–1773, 2014.
- DAVEY, M. E.; GEORGE, a O.; TOOLE, G. a O. Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.
- DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; DE BLOCK, J.; VAN COILLIE, E.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 318–325, 2010.
- DICKSON, J. S.; KOOHMARAIE, M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 832–836, 1989.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.
- DRENKARD, E.; AUSUBEL, F. M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. **Nature**, v. 416, n. 6882, p. 740-743, 2002.
- ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2025-2031, 1999.
- ELHARIRY, H. M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1266–1274, 2011.
- EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfestation using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Enviroment International**, v.30, p.891-900, 2004.
- FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BÉNÉZECH, T. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 892–900, 2001.

FAILLE, C.; JULLIEN, C.; FONTAINE, F.; BELLON-FONTAINE, M.-N.; SLOMIANNY, C.; BENEZECH, T. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 728–738, 2002.

FAILLE, C.; TAUVERON, G.; LE-GENTIL-LELIEVRE, C.; SLOMIANNY, C. Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. **Journal of Food Protection**, v. 10, p. 2346-2353, 2007.

FAILLE, C.; SYLLA, Y.; LE GENTIL, C.; BÉNÉZECH, T.; SLOMIANNY, C.; LEQUETTE, Y. Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 769–776, 2010a.

FAILLE, C.; LEQUETTE, Y.; RONSE, A.; SLOMIANNY, C.; GARÉNAUX, E.; GUERARDEL, Y. Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium. Consequences on their ability to adhere to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 125–135, 2010b.4

FAILLE, C.; BÉNÉZECH, T.; BLEL, W.; RONSE, a.; RONSE, G.; CLARISSE, M.; SLOMIANNY, C. Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 149–157, 2013.

FAILLE, C.; BÉNÉZECH, T.; MIDELET-BOURDIN, G.; LEQUETTE, Y.; CLARISSE, M.; RONSE, G.; RONSE, a.; SLOMIANNY, C. Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. **Food Microbiology**, v. 40, p. 64–74, 2014.

FATEMI, P., FRANK, J. F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/ *Pseudomonas* Biofilms by Peracid Sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 7, p. 761-765, 1999.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema** – 4ª ed. - Editora Artmed, 2010. 900 p.

FERNANDES, M.; FUJIMOTO, G.; SCHNEID, I.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 1, p. 16–23, 2014.

FERNANDES, M.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 97–103, 2015.

FERNANDES, Meg da Silva. **Enterococcus spp. e Bacillus cereus isolados do processamento de ricota: patogenicidade, formação de biofilmes multiespécie e detecção de autoindutores AI-2**. 2014. 219 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de

Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

FINNEGAN, M.; LINLEY, E.; DENYER, S. P.; MCDONNELL, G.; SIMONS, C.; MAILLARD, J. Y. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: Differences between liquid and gas forms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 10, p. 2108–2115, 2010.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749-1757, 2009.

FLINT, S.; PALMER, J.; BLOEMEN, K.; BROOKS, J.; CRAWFORD, R. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 151–157, 2001.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança de Alimentos**, 2^a ed., Artemed: Porto Alegre, pp. 607, 2013.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Milk proteins**. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Eds.), Dairy chemistry and biochemistry, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London, p. 146–238, 1998.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Atheneu: São Paulo, 2002. 182 p.

FRANK, J.F.; YOUSEF, A.E. Tests for groups of microorganisms. In: WEHR, H.M.; FRANK, J.F. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. Washington: American Public Health Association, 2004. 570p.

FROMM, H.I.; BOOR, K.J. Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 207-214, 2004.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p. 1-7, 2000.

GIARDINO, L., AMBU, E., SAVOLDI, E., RIMONDINI, R., CASSANELLI, C., DEBBIA, E. A. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 7, p. 852-855, 2007.

GILBERT, P., D. EVANS, E. EVANS, I. G. DUGUID, AND M. BROWN. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 72–77, 1991.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1165–1171, 2007.

- GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223–228, 1997.
- HARIMAWAN, A.; ZHONG, S.; LIM, C. T.; TING, Y. P. Adhesion of *Bacillus 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.
- HERMANSSON, M. The DLVO theory in microbial adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 14, p. 105–119, 1999.
- HINTON, a R.; TRINH, K. T.; BROOKS, J. D.; MANDERSON, G. J. Thermophile survival in milk fouling and on stainless steel during cleaning. **Trans IChemE**, v. 80, p. 2–7, 2002.
- HOLAH, J. T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance-based surface disinfection test food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.255-259, 1990.
- HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. a. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n. 1, p. 9–18, 1995.
- HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.145-153, 1997.
- HOURY, A.; BRIANDET, R.; AYMERICH, S.; GOHAR, M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. **Microbiology**, v. 156, p. 1009-1018, 2010.
- HUSMARK, U.; RÖNNER, U. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 4, p. 557–562, 1990.
- IBUSQUIZA, P. S.; HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 418–425, 2011.
- JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 367–372, 2001.
- KARUNAKARAN, E.; BIGGS, C. a. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: An investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1161–1175, 2011.
- KIM, J.; HAHN, J. S.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S.; YOON, J. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 129–135, 2009.

KLAUSEN, M.; GJERMENSEN, M.; KREFT, J. U.; TOLKER-NIELSEN, T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: Examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, n. 1, p. 1–11, 2006.

KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, a. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 159–168, 2009.

KRESKE, A.C.; RYU, J.-H.; PETTIGREW, C.A.; BEUCHAT, L.R. Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial produce sanitizer to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* in a liquid detergent, on stainless steel, and in biofilm. **Journal of Food Protection**, v.69, p. 2621–2634, 2006.

KRÓLASIK, J.; ZAKOWSKA, Z.; KRĘPSKA, M.; KLIMEK, L. Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 281–287, 2010.

LAIRD, D.T.; GAMBREL-LENARZ, S.A.; SCHER, F.M.; GRAHAM, T.E.; REDDY, R. Microbial Count Methods. In: WEHR, H.M.; FRANK, J.F. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. Washington: American Public Health Association, 2004. 570p.

LE GENTIL, C.; SYLLA, Y.; FAILLE, C. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 1, p. 37–42, 2010.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, v. 24, p. 281–287, 2007.

LEE, M.-J.; HA, J.-H.; KIM, Y.-S.; RYU, J.-H.; HA, S.-D. Reduction of *Bacillus cereus* Contamination in Biofilms on Stainless Steel Surfaces by Application of Sanitizers and Commercial Detergent. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 89–93, 2010.

LEMOS, M.; MERGULHÃO, F.; MELO, L.; SIMÕES, M. The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 242–248, 2015.

LI, M. Y.; ZHANG, J.; LU, P.; XU, J. L.; LI, S. P. Evaluation of Biological Characteristics of Bacteria Contributing to Biofilm Formation. **Pedosphere**, v. 19, n. 5, p. 554–561, 2009.

LINDSAY, D.; FLINT, S. Biofilm formation by spore-forming bacteria in food processing environments. In: FRATAMICO, P. M.; ANNOUS, B. A.; GUNTHER, N. W. **Biofilms in the food and beverage industries**. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited, p 270–299, 2009.

- LIU, Y.; YANG, S. F.; LI, Y.; XU, H.; QIN, L.; TAY, J. H. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 3, p. 251–256, 2004.
- LUCKING, G.; STOECKEL, M.; ATAMER, Z.; HINRICHS, J.; EHLING-SCHULZ, M. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 270–279, 2013.
- MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2745-2754, 2007.
- MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. a. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.
- MALEK F. Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 17, p. 3836–3844, 2012.
- MARCHAND, S.; DE BLOCK, J.; DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; HEYNDRIKX, M.; HERMAN, L. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 133–147, 2012.
- MARQUES, S. C.; REZENDE, J. D. G. O. S.; ALVES, L. a D. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; DE ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 538–543, 2007.
- MARSHALL, K. C. **Interfaces in microbial ecology**. Harvard University Press, Cambridge, MA, 1976.
- MCLANDBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, a.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, v. 1, n. 2, p. 94–114, 2006.
- MITCHELL, A. C.; PHILLIPS, A. J.; HAMILTON, M. a.; GERLACH, R.; HOLLIS, W. K.; KASZUBA, J. P.; CUNNINGHAM, A. B. Resilience of planktonic and biofilm cultures to supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 318–325, 2008.
- MITTELMAN, M. W. SYMPOSIUM : BIOFILMS : DEVELOPMENT AND CONTROL Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. **Journal of Dairy Science**, p. 2760–2764, 1998.
- MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. a. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 73–87, 2009.

MORAES, M.S.V.; ANDRADE, N.J.; CHAVES, J.B.P.; PASSOS, F.J.V.; GOMIDE, L.A.M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17 n. 3, p. 1-12, 1997.

NASCIMENTO, L. C.; LIMA, L. C. O.; VALLE, R. H. P.; VEIGA, S. M. O. M.; FIORINI, J. E. Uso de derivados clorados, ozônio e ultra-som na sanificação de água e alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 48-57, 2005.

NANASAKI, Y.; HAGIWARA, T.; WATANABE, H.; SAKIYAMA, T. Removability of bacterial spores made adherent to solid surfaces from suspension with and without drying. **Food Control**, v. 21, n. 11, p. 1472–1477, 2010.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M.; ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens**, v. 2, p. 115-129, 2005.

PAGEDAR, A.; SINGH, J. Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. **International Dairy Journal**, v. 23, p. 30–35, 2012.

PALMER, J. S.; FLINT, S. H.; SCHMID, J.; BROOKS, J. D. The role of surface charge and hydrophobicity in the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* isolated from milk powder. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1111–1119, 2010.

PARKAR, S. G.; FLINT, S. H.; PALMER, J. S.; BROOKS, J. D. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 901–908, 2001.

PARKAR, S. G.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli - Potential consequences for cleaning. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 553–560, 2003.

PARKAR, S. G.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 110–116, 2004.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. **Socio microbiology: the connections between quorum sensing and biofilms**. *Trends Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 27-33, 2005.

PEÑA, W. E. L.; DE ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; ALVARENGA, V. O.; RODRIGUES JUNIOR, S.; GRANATO, D.; GIRALDO ZUNIGA, A. D.; DE SOUZA SANT'ANA, A. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 153–158, 2014.

- PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 11–8, 2002.
- PLOMP, M.; LEIGHTON, T.J.; WHEELER, K.E.; MALKIN, A.J. Architecture and high-resolution structure of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore coat surfaces. **Langmuir**, v. 17, p. 7892-7898, 2005.
- POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 361–365, 2000.
- RAJKOWSKI K.T., BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*. In M. D. Miliotis, & J. W. Bier (Eds.), **International Handbook of Foodborne Pathogens** (pp. 27–39). New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc. , 2003. 840 p.
- RATHER, M. A., AULAKH, R. S., GILL, J. P. S., VERMA, R., & RAO, T. S. Enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 81, p. 16-20, 2011.
- RAY, B. **Fundamental Food Microbiology**, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2003. 625 p.
- REYES, J. E.; BASTIAS, J. M.; GUTIERREZ, M. R.; RODRIGUEZ, M. O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2007.
- ROKHINA, E.V., MAKAROVA, K., GOLOVINA, E.A., VAN, A.H., VIRKUTYTE, J., Free radical reaction pathway, thermochemistry of peracetic acid homolysis, and its application for phenol degradation: spectroscopic study and quantum chemistry calculations. **Environmental Science Technology**, v. 44, p. 6815–6821, 2010.
- ROMBAUT, R.; CAMP, J.V.; DEWETTINCK, K. Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 435–443, 2006.
- ROSADO, Marcília Santos. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: modelagem e controle por agentes sanitizantes**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.L; ROSENBERG, E. Bacterial adherence to hydrocarbons. **Microbial Enhanced Oil Recovery** v. 17, p. 114–123, 1980.
- ROSMANINHO, R.; SANTOS, O.; NYLANDER, T.; PAULSSON, M.; BEUF, M.; BENEZECH, T.; YIANTSIOS, S.; ANDRITSOS, N.; KARABELAS, A.; RIZZO, G.; MÜLLER-STEINHAGEN, H.; MELO, L. F. Modified stainless steel surfaces targeted to

reduce fouling - Evaluation of fouling by milk components. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 4, p. 1176–1187, 2007.

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

RÜCKERT, A.; RONIMUS, R. S.; MORGAN, H. W. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 263–272, 2004.

RUECKERT, A.; RONIMUS, R. S.; MORGAN, H. W. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 5, p. 1246–1255, 2005.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2614-2622, 2005.

SALUSTIANO, J. C.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; LIMA, J. C.; BERNARDES, P. C.; LUIZ, L. M. P.; FERNANDES, P. E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, n. 20, v. 4, p. 439-442, 2009.

SALUSTIANO, V. .; ANDRADE, N. .; RIBEIRO JUNIOR, J. .; FERNANDES, P. .; LOPES, J. .; BERNARDES, P. .; PORTUGAL, J. . Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1478–1483, 2010.

SAMAPUNDO, S.; HEYNDRICKX, M.; XHAFERI, R.; DE BAENST, I.; DEVLIEGHERE, F. The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 10–18, 2014.

SCHMIDT, V. S. J.; KAUFMANN, V.; KULOZIK, U.; SCHERER, S.; WENNING, M. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 1-2, p. 1–9, 2012.

SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Revista Microbiologia in foco** - Sociedade Brasileira de Microbiologia, v.1, n. 2, p. 4-12, 2007.

SCOTT, S. a.; BROOKS, J. D.; RAKONJAC, J.; WALKER, K. M. R.; FLINT, S. H. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 109–117, 2007.

SEALE, R. B.; FLINT, S. H.; MCQUILLAN, a. J.; BREMER, P. J. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 731–737, 2008.

SEALE, R. B.; BREMER, P. J.; FLINT, S. H.; MCQUILLAN, a. J. Characterization of spore surfaces from a *Geobacillus* sp. isolate by pH dependence of surface charge and infrared spectra. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1339–1348, 2010.

SHAHEEN, R.; SVENSSON, B.; ANDERSSON, M. a.; CHRISTIANSSON, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 347–355, 2010.

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

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research**, v. 43, p. 229–237, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573–583, 2010.

SPRATT, D. A., PRATTEN, J., WILSON, M., GULABIVALA, K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 4, p. 300-307, 2001.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

SVENSSON, B.; ENEROTH, Å.; BRENDEHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 12, p. 903–912, 1999.

SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDEHAUG, J.; MOLIN, G.; CHRISTIANSSON, A. Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 455–460, 2000.

SVENSSON, B.; EKELUND, K.; OGURA, H.; CHRISTIANSSON, A. **Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants.** *International Dairy Journal*, v. 14, n. 1, p. 17-27, 2004.

TAUVERON, G.; SLOMIANNY, C.; HENRY, C.; FAILLE, C. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food

surface equipment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 254–262, 2006.

TOTÉ, K., HOREMANS, T., VANDEN BERGHE, D., MAES, L., COS, P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 10, p. 3135-3142, 2010.

TROLLER, J. A. **Sanitation in Food Processing**. 2th Ed. Academic Press, 1993, 456p.

UBBINK, J.; SCHAR-ZAMMARETTI, P. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 263-270, 2007.

UKUKU, D.O.; FETT, W.F. Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 7, p. 1093-1099, 2002.

VERRAN, J. Biofouling in Food Processing: Biofilm or Biotransfer Potential ? **Trans IChemE**, v. 80, p. 292-298, 2002.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 456–467, 2013.

WIJMAN, J. G. E.; DE LEEUW, P. P. L. A; MOEZELAAR, R.; ZWIETERING, M. H.; ABEE, T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1481–1488, 2007.

WILLIAMS, V.; FLETCHER, M. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 100–104, 1996.

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.

WIRTANEN, G., SALO, S. Biofilm Risks. In: LELIEVELD, H. L. M., MOSTERT, M. A., HOLAH, J. T. (Eds.), **Handbook of Hygiene Control in the Food Industry**. Woodhead. Pub: Cambridge, England, p. 46-68, 2005.

WONG, H. C.; CHANG, M. H.; FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 699–702, 1988.

YOUNG, S. B.; SETLOW, P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. **Journal Applied Microbiology**, n. 95, v. 1, p. 54-67, 2003.

ZOTTOLA, E. A; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry-- should they be a concern? **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–148, 1994.

ANEXO 1

POTENCIAL ZETA DAS DIFERENTES CEPAS DE ESPOROS DE *B. cereus*

Autotitration Report

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Titration Type: pH Titration

Measurement Type(s): Zeta

Sample Name: 176 esporo_7 a 2_rep 6

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: 140115.dts

Record Number: 14

Measurement Date and Time: quarta-feira, 14 de janeiro de...

System

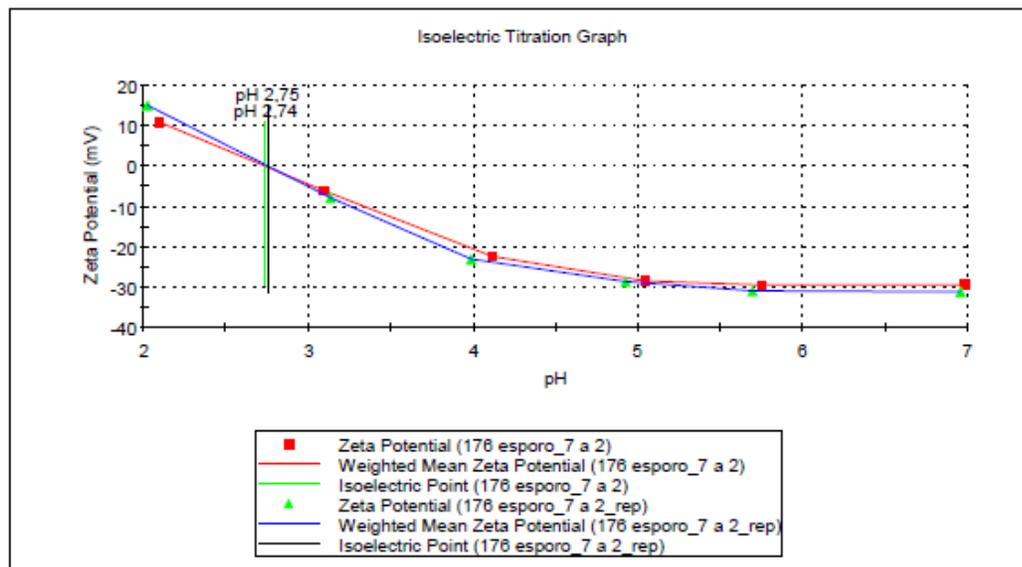
Cell Description: Clear disposable zeta cell

Titriments

	Type	Name	
Bottle 1:	Not used	HCl	0,500
Bottle 2:	Base	NaOH	0,500
Bottle 3:	Acid	HCl	0,500

Results

Total Injected Volume (mL): 0,307



Autotitration Report

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Titration Type: pH Titration

Measurement Type(s): Zeta

Sample Name: 174 esporo_7 a 2_rep 6

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: 150115.dts

Record Number: 28

Measurement Date and Time: quinta-feira, 15 de janeiro de...

System

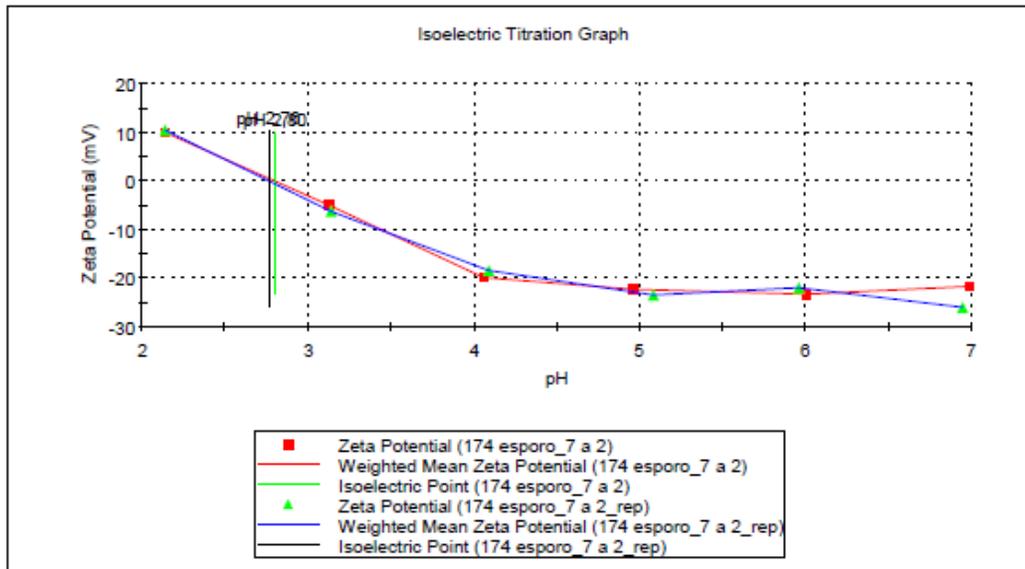
Cell Description: Clear disposable zeta cell

Titrants

	Type	Name	
Bottle 1:	Not used	HCl	0,500
Bottle 2:	Base	NaOH	0,500
Bottle 3:	Acid	HCl	0,500

Results

Total Injected Volume (mL): 0,230



Autotitration Report

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Titration Type: pH Titration

Measurement Type(s): Zeta

Sample Name: 167 esporo_7 a 2 5

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: 120115_M.dts

Record Number: 23

Measurement Date and Time: segunda-feira, 12 de janeiro ...

System

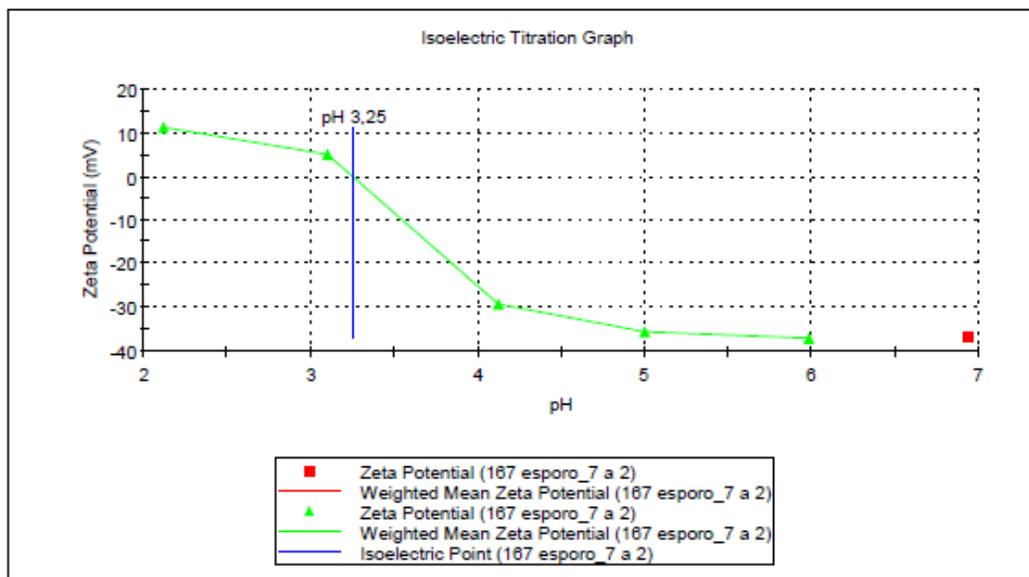
Cell Description: Clear disposable zeta cell

Titants

	Type	Name	
Bottle 1:	Not used	HCl	0,500
Bottle 2:	Base	NaOH	0,500
Bottle 3:	Acid	HCl	0,500

Results

Total Injected Volume (mL): 2,27



Autotitration Report

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Titration Type: pH Titration

Measurement Type(s): Zeta

Sample Name: 167 esporo_7 a 2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: 120115_M.dts

Record Number: 31

Measurement Date and Time: terça-feira, 13 de janeiro de ...

System

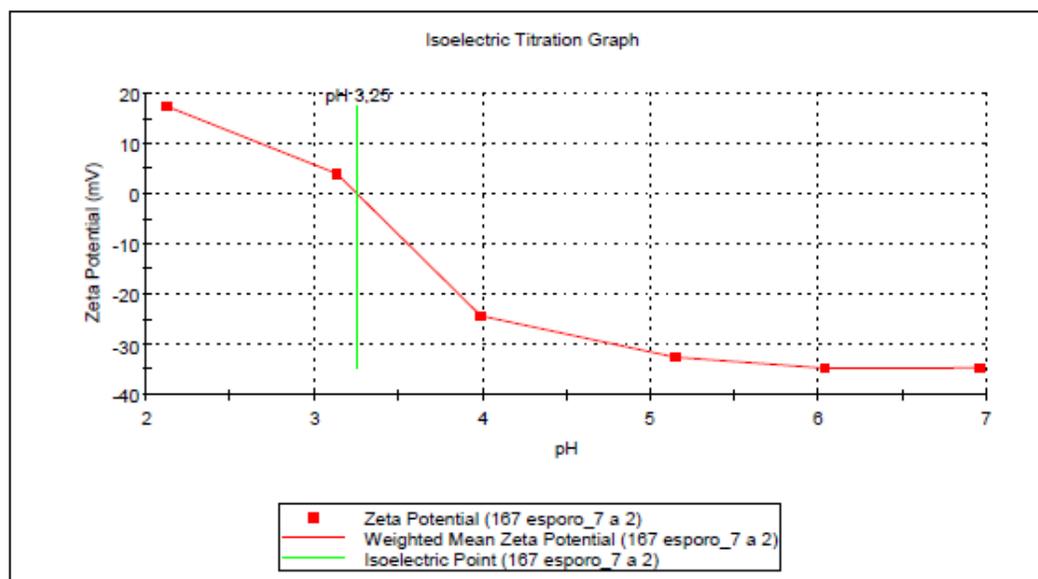
Cell Description: Clear disposable zeta cell

Titants	Type	Name	Concentration (M)
Bottle 1:	Not used	HCl	0,500
Bottle 2:	Base	NaOH	0,500
Bottle 3:	Acid	HCl	0,500

Results

IEP(s) in (pH): 3,25

Total Injected Volume (mL): 0,284



Autotitration Report

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Titration Type: pH Titration

Measurement Type(s): Zeta

Sample Name: 164 esporo_7 a 2_rep

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: 150115.dts

Record Number: 8

Measurement Date and Time: quinta-feira, 15 de janeiro de...

System

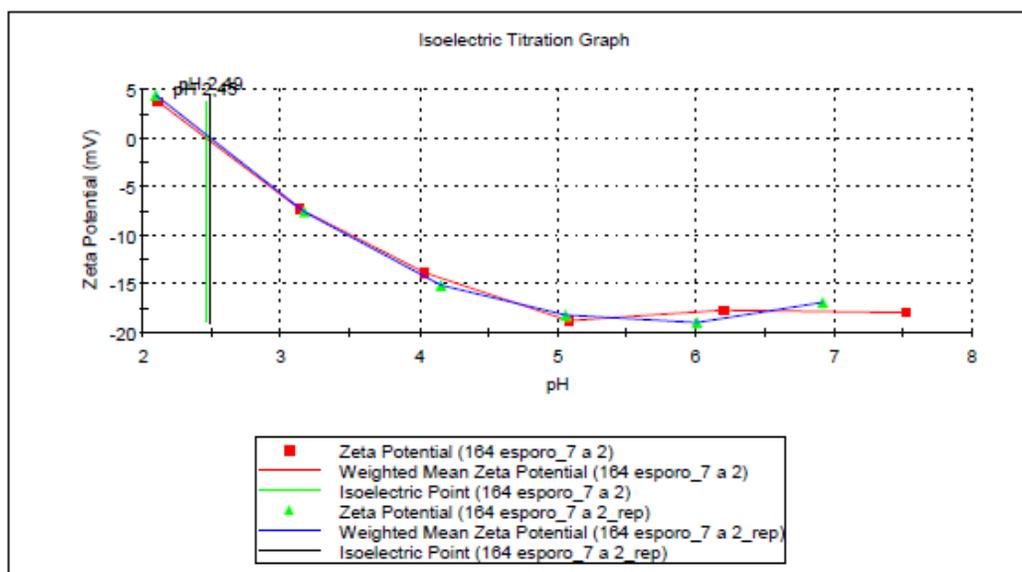
Cell Description: Clear disposable zeta cell

Titants	Type	Name	Concentration (M)
Bottle 1:	Not used	HCl	0,500
Bottle 2:	Base	NaOH	0,500
Bottle 3:	Acid	HCl	0,500

Results

IEP(s) in (pH): 2,49

Total Injected Volume (mL): 0,273



Autotitration Report

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Titration Type: pH Titration

Measurement Type(s): Zeta

Sample Name: Pool esporo esporo_7 a 2_rep2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: 200115.dts

Record Number: 15

Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de janeiro de ...

System

Cell Description: Clear disposable zeta cell

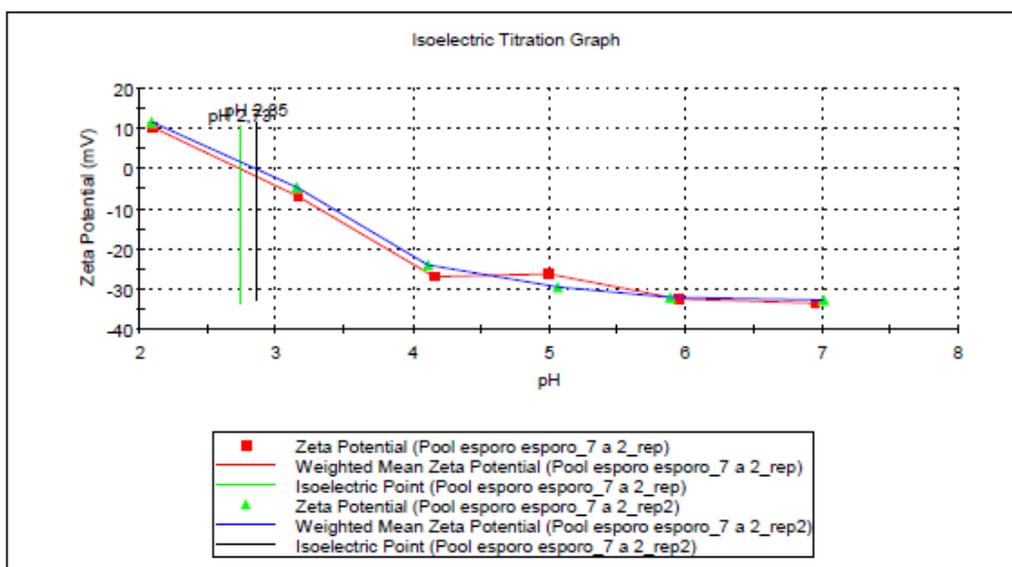
Titrants

	Type	Name	Concentration (M)
Bottle 1:	Not used	HCl	0,500
Bottle 2:	Base	NaOH	0,500
Bottle 3:	Acid	HCl	0,500

Results

IEP(s) in (pH): 2,85

Total Injected Volume (mL): 0,267



Autotitration Report

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Titration Type: pH Titration

Measurement Type(s): Zeta

Sample Name: ATCC esporo_7 a 2_rep

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: 200115.dts

Record Number: 29

Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de janeiro de ...

System

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Titants	Type	Name	Concentration (M)
Bottle 1:	Not used	HCl	0,500
Bottle 2:	Base	NaOH	0,500
Bottle 3:	Acid	HCl	0,500

Results

IEP(s) in (pH): 3,44

Total Injected Volume (mL): 0,260

