



VANESSA PEREIRA PEREZ ALONSO

BIOFILMES MONOESPÉCIE E MULTIESPÉCIES DE PATÓGENOS
GRAM-POSITIVOS DE ORIGEM LÁCTEA EM DIFERENTES
SUBSTRATOS

CAMPINAS
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

VANESSA PEREIRA PEREZ ALONSO

**BIOFILMES MONOESPÉCIE E MULTIESPÉCIES DE
PATÓGENOS GRAM POSITIVOS DE ORIGEM LÁCTEA EM
DIFERENTES SUBSTRATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki

Este exemplar corresponde a versão final da Dissertação da aluna Vanessa Pereira Perez Alonso, orientada da professora Dra. Dirce Yorika Kabuki.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dirce Yorika Kabuki", is written over a horizontal line.

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki

CAMPINAS

2015

Agência de fomento: Não se aplica
Nº processo: Não se aplica

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

AL72b Alonso, Vanessa Pereira Perez, 1979-
Biofilmes monoespécie e multiespécies de patógenos gram-positivos de
origem láctea em diferentes substratos / Vanessa Pereira Perez Alonso. –
Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Dirce Yonka Kabuki.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Biofilme. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. *Listeria monocytogenes*. 4. *Bacillus cereus*. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Kabuki, Dirce Yonka. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mono-specie and multi-species biofilm of gram-positives pathogens
isolated from dairy products in different substrates

Palavras-chave em inglês:

Biofilm

Enterococcus faecalis

Listeria monocytogenes

Staphylococcus aureus

Bacillus cereus

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Títuloção: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Dirce Yonka Kabuki [Orientador]

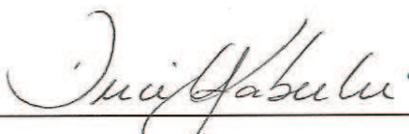
Meg da Silva Fernandes

Valeria Christina Amstalden Junqueira

Data de defesa: 04-09-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

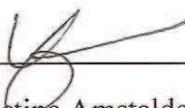
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki
Orientador



Dra. Meg da Silva Fernandes
UEL
Titular



Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
ITAL
Titular

Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis
USP
Suplente

Dr. Rafael Djalma Chaves
UNICAMP

RESUMO

Patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), frequentemente são encontrados em produtos lácteos e preocupam a indústria de alimentos por sua capacidade de formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável. *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são patógenos Gram-positivos encontrados em produtos lácteos e, neste estudo, a capacidade de formação de biofilme monoespécie e multiespécies em superfície de aço inoxidável a 25°C em diferentes substratos foram avaliadas. A formação dos biofilmes foi verificada pela técnica da contagem em placas nos tempos 6h, 24h, 48h, 96h, 168h e 240h. Os cupons de aço inoxidável (AISI 304) foram imersos em diferentes substratos (infusão de cérebro e coração (BHI), soro de leite e leite desnatado), inoculados com aproximadamente 10^3 UFC/ml de patógenos de origem láctea. Os microorganismos avaliados foram capazes de formar biofilmes monoespécie e multiespécies, com contagens de até 7 log UFC/cm². Foi observado maior esporulação de *B. cereus* em caldo BHI e leite desnatado, quando comparado com soro de leite. *E. faecalis* apresentou maior crescimento quando em biofilme multiespécies e quando em monoespécie maior equilíbrio entre os diferentes substratos. Por outro lado, *S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes* quando em biofilme multiespécies no soro de leite, apresentaram pouco crescimento, sendo que *L. monocytogenes* apresentou o mesmo padrão de comportamento também no leite desnatado.

Palavras chaves: *Enterococcus faecalis*. *Listeria monocytogenes*. *Bacillus cereus*. *Staphylococcus aureus*. Biofilmes.

ABSTRACT

Pathogens that cause food-borne diseases are often found in dairy products and are concerned about the food industry for their ability to form biofilm on surfaces of stainless steel. *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* are Gram-positive pathogens found in milk products and, in this study, the ability to form single-specie and multi-species biofilm on stainless steel surface at 25°C in different substrates were evaluated. The formation of biofilms was verified by plate count technique at 6h, 24h, 48h, 96h, 168h and 240h. The coupons of stainless steel (AISI 304) were placed in different substrates, brain heart infusion broth (BHI), whey and skim milk, inoculated with approximately 10^3 CFU/ml of pathogens isolated from of dairy products. The microorganisms were capable to form mono-specie and multi-species biofilms, with counts of up to 7 log CFU/cm². The sporulation of *B. cereus* was higher in BHI broth and skim milk, when compared with whey. *E. faecalis* showed greater growth when in multi-species biofilm and when in single-specie similar behavior was observed among the substrates. Moreover *S. aureus*, *B. cereus* and *L. monocytogenes* showed little growth in multi-species biofilm in whey, and *L. monocytogenes* presented the same pattern of behavior also in skim milk.

Palavras chaves: Biofilm. *Enterococcus faecalis*. *Listeria monocytogenes*. *Bacillus cereus*. *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

	<u>Pág.</u>
1	INTRODUÇÃO 1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 5
2.1.	Patógenos presentes na indústria láctea 5
2.1.1.	<i>Bacillus cereus</i> 7
2.1.2.	<i>Listeria monocytogenes</i> 10
2.1.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> 13
2.1.4.	<i>Enterococcus faecalis</i> 15
2.2.	Biofilme 19
2.3.	Biofilme na indústria de alimentos 24
2.4.	Biofilmes multiespécies..... 29
3	OBJETIVO GERAL 31
3.1.	Objetivos específicos..... 31
4	MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1.	Cepas bacterianas utilizadas 33
4.2.	Preparo da suspensão de culturas 33
4.3.	Preparo dos cupons de aço inoxidável..... 34
4.4.	Escolha do meio de cultura 34
4.5.	Formação de Biofilmes Monoespécie e Multiespécies em diferentes substratos 35
4.5.1.	Ensaio..... 35
4.6.	Contagem de micro-organismos 37

4.7.	Análise Estatística	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	Escolha do meio de cultura	39
5.2.	Formação de biofilme monoespécies	40
5.2.1.	Formação de biofilme de <i>Enterococcus faecalis</i> em superfície de aço inoxidável em presença de diferentes substratos	40
5.2.2.	Formação de biofilme monoespécie de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos.....	45
5.2.3.	Formação de biofilme monoespécie de <i>Staphylococcus aureus</i> em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos.....	50
5.2.4.	Formação de biofilme monoespécie de <i>Bacillus cereus</i> em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos	55
5.3.	Formação de biofilme multiespécies	62
5.3.1.	Comportamento de <i>Enterococcus faecalis</i> em biofilme multiespécie, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos	63
5.3.2.	Comportamento da <i>Listeria monocytogenes</i> em biofilme multiespécies, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos	68
5.3.3.	Comportamento do <i>Staphylococcus aureus</i> em biofilme multiespécies, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos	71
5.3.4.	Comportamento do <i>Bacillus cereus</i> em biofilme multiespécie, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos.....	74
6	CONCLUSÃO	81
Anexos		99

“As únicas coisas que podemos conservar são as que entregamos a Deus. As que guardamos para nós são as que perderemos com certeza”.

C. S. Lewis

À Deus, por ser o meu alicerce nesse mundo.

A Jennifer, minha filha amada, meu tudo.

Aos meus pais por tudo o que sou.

E aos meus irmãos,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me conduz por caminhos inexprimíveis. Sem ele eu não teria conseguido permanecer nessa jornada!

A minha filha por ser a minha maior motivação em seguir em frente. Pelo seu carinho, amor e paciência, até mesmo na minha ausência. Por todas as risadas e denço, todos os beijos e abraços, broncas e despertar, que me levam a permanecer nessa vida com alegria. Amo você mais que tudo. É a minha luz!

Ao meu pai (In memoriam) por ter me acompanhado ainda durante o processo de seleção de mestrado. A minha mãe por sempre estimular a busca pelo conhecimento. Aos meus irmãos pelo carinho e amor. A minha sobrinha Vitória pelas brincadeiras e alegria. A minha avó Rosa (In memoriam) por toda a dedicação e empenho na minha criação. Amo vocês!

As minhas tias Muriene, Mary, Assunta e a minha prima Karina, pela acolhida em Campinas, logo nos primeiros meses do meu mestrado.

A minha tia Neuza pelas vindas até a Unicamp, conversas e apoio.

A minha orientadora Prof. Dra. Dirce pela confiança que depositou na minha capacidade de desenvolver este trabalho, mesmo diante das minhas limitações. Por todo conhecimento, respeito e carinho que recebi durante o período de orientação.

A minha grande amiga de infância Fanny por estar presente em todos os momentos. E também a seus pais que sempre me acolheram como se eu fosse uma filha! Por todo carinho e amor que sempre recebi de vocês, obrigada por ser parte da minha vida.

À todos os meus amigos e colegas pelas horas de conversa, apoio e risada! Em especial ao Tomas pela presença, risadas, conselhos e carinho que recebi durante o meu retorno para Campinas. A Mayra pela ajuda no trabalho aos finais de

semana e todo apoio. A Cristiane que sempre esteve do meu lado, como uma irmã, cuidando de mim. A Camila pelas horas de estudos, noites em claro, conversas, conselhos e amizade sincera! A Maris pelas risadas e parceria nos últimos seis meses. Ao Lucas pela força e apoio em todas as horas desde a faculdade. Ao Eduardo que sempre esteve por perto, aconselhando, me ouvindo e rindo das minhas histórias.

A Mayara por ser um incentivo desde a época da faculdade quando me ajudou com o trabalho de iniciação e atualmente com a sua disponibilidade por me ajudar esclarecendo dúvidas.

As pessoas que estiveram do meu lado no laboratório, em especial a Andréia que me ensinou a trabalhar com Biofilme e compartilhou comigo parte do seu conhecimento e que sempre me ajudou com todo empenho e carinho. A técnica de laboratório e colega de mestrado Juliana pela ajuda, apoio, suporte e por toda paciência e respeito. Ao estagiário Mateus pelas risadas. A colega de laboratório Taísa por todas as horas de almoço e companhia. A Karen e a Erica pelas conversas agradáveis. A Taicy e a Gabriela por toda colaboração e ajuda na reta final do trabalho! Sem a participação de vocês nada disso seria possível!

À CAPES pelo auxílio financeiro. À empresa Porto Alegre e Alibra por terem fornecido o soro de leite utilizado na realização deste trabalho.

A todos os professores, funcionários, colegas e amigos que cruzaram o meu caminho e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E também aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões na conclusão deste trabalho.

Ao Departamento de Ciência de Alimentos.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1 - Fluxograma dos ensaios 1 (BHI), ensaio 2 (Soro de Leite) e ensaio 3 (Leite desnatado).....	36
Figura 2 - Evolução do <i>E. faecalis</i> na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo.	42
Figura 3 - Decréscimos de células do <i>E. faecalis</i> em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	43
Figura 4 - Evolução do <i>L. monocytogenes</i> na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo.	47
Figura 5 - Decréscimos de células do <i>L.monocytogenes</i> em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	49
Figura 6 - Evolução do <i>S. aureus</i> na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos	52
Figura 7 – Evolução do crescimento de <i>E.faecalis</i> , <i>L.monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em biofilme monoespécie na presença de soro de leite e leite desnatado em aço inoxidável.53	53
Figura 8 – Decréscimos de células do <i>S. aureus</i> em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	54
Figura 9 - Evolução do <i>B. cereus</i> na formação do biofilme monoespécie em diferentes substratos	57
Figura 10 – Decréscimos de células do <i>B.cereus</i> em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	58
Figura 11 – Comparação do crescimento de <i>E.faecalis</i> , <i>L.monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> e <i>B.cereus</i> em biofilme de monoespécies na presença de soro de leite e leite desnatado. ...	59
Figura 12 – Esporulação do <i>B cereus</i> na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo.	61
Figura 13 – Evolução do <i>E. faecalis</i> na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.	64
Figura 14 - Comparação do crescimento dos biofilmes de <i>E. faecalis</i> quando em monoespécie e multiespécies na presença de soro de leite e leite desnatado.....	65
Figura 15 - Decréscimos de células do <i>E. faecalis</i> em biofilme multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	66
Figura 16 - Evolução do <i>L.monocytogenes</i> na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.	69

Figura 17 - Decréscimos de células do <i>L. monocytogenes</i> em biofilme multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	70
Figura 18 - Evolução do <i>S. aureus</i> na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.	72
Figura 19 - Decréscimo de células do <i>S. aureus</i> em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	73
Figura 20 - Evolução do <i>B. cereus</i> na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.	75
Figura 21 - Decréscimo de células do <i>B. cereus</i> em biofilme multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm ²).	76
Figura 22 – Esporulação do <i>B. cereus</i> na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.	77
Figura 23 – Comportamento dos micro-organismos (<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>S. aureus</i>) em diferentes substratos (BHI, soro de leite e leite desnatado) ao longo dos tempos de contagens.....	79

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 – Cepas de origem láctea utilizadas para preparação do inoculo na formação do biofilmes monoespécie e multiespécies.	33
Tabela 2 - Meios de culturas seletivos testados para cada micro-organismo.....	35
Tabela 3. Meios seletivos testados para contagem das cepas de micro-organismos	39
Tabela 4. Médias das contagens de <i>E. faecalis</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie na superfície de aço inoxidável em diferentes substratos	41
Tabela 5 – Valores de pH na formação de biofilme monoespécie de <i>E. faecalis</i> medido ao longo do tempo	44
Tabela 6. Médias das contagens de <i>L.monocytogenes</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos	46
Tabela 7 – Valores de pH no biofilme monoespécie de <i>L.monocytogenes</i> medido ao longo do tempo	50
Tabela 8. Médias das contagens de <i>S.aureus</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos	51
Tabela 9 – Valores de pH medido na formação de biofilme monoespécie de <i>S.aureus</i> medido ao longo do tempo.	55
Tabela 10 - Médias das contagens de <i>B. cereus</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos	56
Tabela 11 – Valores de pH na formação de biofilme monoespécie de <i>B. cereus</i> medido ao longo do tempo	58
Tabela 12. Médias das contagens de esporos de <i>B. cereus</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilme monoespécie sobre superfície de aço Inoxidável em diferentes substratos..	60
Tabela 13. Médias das contagens de <i>E. faecalis</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de multiespécies em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos.....	63
Tabela 14 – Valores de pH na formação de biofilme multiespécies medido ao longo do tempo	67
Tabela 15 Médias das contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de multiespécies em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos.....	68
Tabela 16 Médias das contagens de <i>S.aureus</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de multiespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos	72
Tabela 17. Médias das contagens de <i>B. cereus</i> (log UFC/cm ² ±desvio padrão) em biofilmes de multiespécies em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos	75

Tabela 18. Médias das contagens de esporos de *B. cereus* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilme multiespécies sobre superfície de aço Inoxidável em diferentes substratos. 77

1 INTRODUÇÃO

A indústria de produtos lácteos impressiona pela produção mundial. Estima-se que em 2013 processou 468 milhões de toneladas de leite de vaca e mais de 17 milhões de toneladas de queijos. Entre os maiores produtores, destacam-se países como Estados Unidos, Índia, China, Brasil, Rússia, Alemanha, França, Nova Zelândia e o Reino Unido (FAO, 2014).

O número de consumidores de leite e produtos lácteos ultrapassam 6 bilhões de pessoas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (FAO, 2014). É estimado que o consumo *per capita* de leite no Brasil seja de 170 litros de leite/habitante/ano. Apesar do aumento gradual do consumo, ele está abaixo do recomendado pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial da Saúde que é de 210 litros de leite por ano (BRASIL, 2014).

No ano de 2014 o Brasil foi responsável por gerar 27,5 milhões de reais com a produção de leite, equivalente a 10% do valor produzido pela agropecuária brasileira, movimentando parte da economia de várias cidades em diferentes estados do país (BRASIL, 2015; IBGE, 2010).

A variedade de produtos lácteos é um desafio para os profissionais da área, visto que se trata de uma matéria prima de alto valor nutritivo, altamente perecível e com excelentes condições de crescimento para os micro-organismos indesejáveis (patógenos e deteriorantes), (FAO, 2014; BEHMER, 1991).

A busca por soluções para impedir a entrada, permanência e multiplicação dos micro-organismos, bem como a inativação de enzimas e subprodutos metabólitos é parte da rotina da indústria de alimentos que se preocupa com os impactos negativos em relação à segurança e qualidade do produto final, para que não ofereça riscos para a saúde do consumidor (LEDENBACH, MARSHALL, 2009; BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007).

Os prejuízos econômicos nas indústrias de alimentos, muitas vezes estão relacionados com a participação dos biofilmes nas plantas de processamentos, que promovem o aumento da resistência microbiana aos agentes de limpeza e desinfecção, favorecendo a contaminação cruzada pós-processamento e reduzindo a vida útil do produto. (ANAND *et al.*, 2014; BROOKS, FLINT, 2008; KUMAR, ANAND, 1998). A intervenção na formação de biofilmes é uma necessidade da indústria e gera uma discussão abrangente, envolvendo tratamentos físicos e químicos (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007).

Novas abordagens e pesquisas voltadas para medida de prevenção são realizadas com o intuito de contribuir para a eliminação dos biofilmes e redução dos prejuízos (DAT *et al.*, 2012). Dentre essas possíveis modificações e regulações atenção especial é dada para fatores como pH (SCANNAPIECO *et al.*, 1987), condicionamento da superfície (HELKE, SOMERS, WONG, 1993), modificação do ambiente (STEPANOVIC *et al.*, 2003) e a regulação *quorum sensing* (IRIE, PARSEK, 2008).

Estratégias de prevenção e controle de formação de biofilme envolvem higiene operacional, desenho dos equipamentos, *layout* da indústria, escolha dos materiais, uso correto e seleção dos desinfetantes, procedimentos CIP (*Cleaning in Place*) e uso de bacteriocinas e enzimas como uma estratégia para controle biológico (KUMAR, ANAND 1998).

Meios alternativos de controle do desenvolvimento de biofilme são necessários para facilitar o processo de desinfecção (WINJMAN *et al.*, 2007) e garantir a qualidade e segurança dos alimentos (KUMAR, ANAND, 1998). Para isso, é importante conhecer o comportamento dos micro-organismos frente aos diferentes substratos e a interação entre as espécies.

Sabe-se que mais de 90% dos micro-organismos existentes sobrevivem em forma de biofilmes e que 70% das infecções humanas são causadas por bactérias em forma de biofilme (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Diante da

diversidade de produtos lácteos, falhas no processo de higienização, prejuízos econômicos, aliado aos poucos estudos sobre biofilmes multiespécies este trabalho visa avaliar o comportamento de patógenos, para que no futuro, possa auxiliar nas soluções efetivas em relação à redução e inibição do biofilme na indústria láctea.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Patógenos presentes na indústria láctea

A presença de patógenos em alimentos é um perigo para a saúde do consumidor. As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) afetam 1 em cada 6 americanos ao ano, sendo 128 mil hospitalizados e 3.000 chegam a óbitos (CDC, 2014a). Surtos já foram associados ao consumo de leite pasteurizado ou não pasteurizado e seus derivados (ASAO, KUMEDA, KAWAI, 2003; MEAD, SLUTSKER, DIETZ, 1999; GRAVANI, 1999; ADESIYUN, WEBB, ROMAIN , 1998).

Segundo a Organização Mundial da saúde, mais de um terço da população mundial adoecem por causa do surto de DTA e poucos são os casos notificados (ANR, 2015). Existem registros com mais de 250 tipos de DTAs, sendo que a maioria é provocada por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas (SUS, 2015).

O leite é uma via de entrada de patógenos em plantas de processamentos e contribui para a persistência desses micro-organismos em biofilmes. Conseqüentemente geram contaminação e recontaminação após a pasteurização dos produtos lácteos e aumentam o risco de exposição do consumidor a esses micro-organismos (OLIVER, JAYARÃO, ALMEIDA, 2005).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos investigou alguns surtos entre 1998 a 2011 relacionados ao consumo de produtos lácteos e verificam que 79% foram devido ao consumo de leite cru ou queijo. O número de registro de surtos aumentou de 30 para 51 quando comparado o período de 2007-2009 e 2010-2012, por contaminação com leite cru não pasteurizado. A maioria das doenças foi causada por *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Entre os anos de 1993 até 2006, 121 surtos envolvendo produtos lácteos, foram notificados nos Estados

Unidos ao CDC, onde 4.413 pessoas ficaram doentes, 239 pessoas foram internadas e 3 morreram (MUNDAI, BEHRAVESH, GOULD 2015; CDC, 2014b; CDC, 2013b).

Aqui no Brasil, dados analisados entre janeiro de 2000 até maio de 2015, mostram que 10.666 casos de surtos foram detectados no Brasil, sendo que 209.240 pessoas adoeceram e 2.095.354 foram expostos aos alimentos contaminados. Neste período 154 óbitos foram registrados, e nesse mesmo período o número uma diferença (BRASIL, 2015a; ANR, 2015).

A eliminação de patógenos em leites e derivados é garantida com a pasteurização, apesar disso, surtos de doenças associadas a tais produtos continuam a ocorrer. Entre as principais causas de contaminação pós-pasteurização destacam-se o ambiente, armazenamento impróprio e a contaminação através do manipulador de alimentos (CDC, 2014a; CDC, 2014b; CDC, 2013a).

Os micro-organismos podem entrar nas indústrias de leite e derivados através da matéria prima de baixa qualidade, proveniente de mastite e da contaminação durante a ordenha, (teto do animal, solo, alimentação, material da cama do animal, sala de ordenha e demais equipamentos) e permanecer devido às falhas nos processos de higienização. Estes micro-organismos podem aderir aos tanques de expansão e tubulações, permanecendo durante os processamentos devido as falhas nos processos de higienização, alcançando as linhas de processamento e armazenamento, favorecendo assim a contaminação cruzada de produtos lácteos (PAGEDAR, SINGH, 2012; MARCHAND *et al.*, 2012).

A preocupação com a segurança dos alimentos, incluindo o ambiente de produção, tornou-se um desafio para a indústria de alimentos, e em conjunto com os órgãos de fiscalizações e o meio acadêmico, buscam soluções efetivas para tais situações. A observação científica e a pesquisa devem ajudar a responder algumas questões (CDC, 2013a).

Na presença de nutrientes e em temperatura favorável, o desenvolvimento de biofilmes em superfícies de contato pode ocorrer e estes podem conter uma única espécie ou várias espécies, envolta por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), (CHMIELEWSKI, FRANK, 2003; SHARMA, ANAND, 2002).

As temperaturas encontradas em laticínios geralmente são baixas, embora alguns processos de produção alcancem temperaturas mais elevadas que 30°C, como por exemplo, nas linhas de produção de queijos e iogurtes. Nestes ambientes o biofilme pode se formar nas placas de trocadores de calor em equipamentos de pasteurização, podendo contaminar o produto final (KNIGHT, NICOL, MCMEEKIN, 2004; FLINT, BREMER, BROOKS, 1997).

A indústria láctea é reservatório de diferentes micro-organismos: *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Streptococcus* e *Chryseobacterium*. Alguns patógenos são frequentemente encontrados, incluindo *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*. (FERNANDES, 2014; ANAND, SINGH, 2013; ESPER, KABUKI, KUAYE, 2011; SALO *et al.*, 2006; SHARMA, ANAND, 2002; WAAK, THAM, DANIELSSON-THAM, 2002; WIEDMANN *et al.*, 2000; KUMAR, ANAND, 1998; WONG, 1998; SOMERS, SCHOENI, WONG *et al.*, 1994).

2.1.1. *Bacillus cereus*

B. cereus são bastonetes Gram-positivos que possuem flagelos peritriquios e são produtores de esporos. Considerados mesófilos e anaeróbios facultativos, apresentam boa multiplicação em alimentos com valores de pH entre 4,8 e 9,3 e toleram até 7,5% de sal. Possuem a capacidade de utilizar alguns carboidratos, como a glicose, frutose, trealose, salicina, maltose e manose. São produtores de catalase, hemolisinas, fosfolipases do tipo C e oxidase variável (DOYLE, BEAUCHEAT, 2007; FRANCO, LANDGRAF, 2002).

Esta bactéria é responsável por diversos casos de DTA, podem causar duas formas distintas de gastroenterite: a síndrome emética, caracterizada por vômitos e a diarreica, por diarreia. A síndrome emética é causada por uma toxina termoestável e seu período de incubação médio é de nove horas. Os alimentos associados são arroz e alimentos ricos em amidos, como por exemplo, batata, massas em geral, misturas alimentares como pudins, sopas, bolos e molhos para saladas. A síndrome diarreica é causada por uma toxina termolábil, que pode ser destruída por aquecimento a 55°C por 20 minutos. Os sintomas duram em média 24 horas e os alimentos associados a esta síndrome são produtos cárneos, pescados, vegetais crus e cozidos, massas e leite (FDA, 2015; DOYLE, BEAUCHEAT, 2007; TRABULSI, ALTERTHUM, 2005; FRANCO, LANDGRAF, 2002).

Tais síndromes só se manifestam quando existe um elevado número de células viáveis, que podem variar entre 10^5 e 10^9 (FDA, 2015; DOYLE, BEAUCHEAT, 2007). A confirmação do agente etiológico de um surto pode ser feito através do isolamento de cepas de alimentos suspeito, ou material clínico como vômitos e fezes do paciente, contribuindo para um diagnóstico efetivo (FDA, 2015).

Vários surtos já foram relatados associados a esses micro-organismos. Na Romênia, 221 crianças foram atingidas através do consumo de leite (CHRISTIANSSON, 1992). No Canadá, dois surtos foram registrados, um em 1988, onde 36 pessoas ficaram doentes após o consumo de *milk shake* em um *fast food* e em 1989, onde 74 pessoas adoeceram após o consumo de leite em uma escola (BC CDC, 2015). Três surtos com este micro-organismo também foram registrados na Espanha e na Holanda, entre 1986 a 1989 (VAN *et al.*, 1990). Nos Estados Unidos entre 1998 a 2008 dois surtos ocorreram com produtos lácteos e 18 pessoas adoeceram (CDC, 2013c). No Brasil, um surto ocorreu em *esfihas* com recheios de queijo, carne e espinafre em uma rede de *fast food*, no ano de 2012, onde 23 casos foram apurados (CIEVS, 2012).

B.cereus são consideradas cepas sobreviventes pós-pasteurização, devido a sua capacidade de esporular. Os esporos produzidos por este micro-organismo são comuns em produtos agrícolas in natura, sendo o solo um reservatório natural (FRANCO, LANDGRAF, 2002; FLINT *et al.*, 1997). Os esporos podem sobreviver aos processamentos térmicos na indústria de leite e derivados (ANAND *et al.*, 2014; BROOKS, FLINT, 2008; PARKAR *et al.*, 2001) e também aos processos de limpeza (LINDSAY, BROZEL, VON, 2006), desempenhando papel importante na formação do biofilme (PARKAR *et al.*, 2001).

Estes micro-organismos podem deteriorar os produtos, afetando o prazo de validade e ameaçando a segurança dos alimentos. *B. cereus* estão presentes na alimentação animal, no teto do animal, no material proveniente da fazenda e nos equipamentos da ordenha (ANKITA, JITENDER, 2012; HORNSTRA *et al.*, 2007). A bactéria já foi encontrada germinando e se multiplicando em trocadores de calor (ANAND *et al.*, 2014; BROOKS, FLINT, 2008), em tanque de silo usado para armazenar leite (PAGEDAR, SINGH, 2012) e em membrana de osmose reversa, promovendo a contaminação cruzada em soro de leite, assim como *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.* (ANAND *et al.*, 2014).

No Brasil, 63 amostras de derivados de leite comercializadas na cidade de Campinas (SP, Brasil) foram coletadas, sendo 24 sorvetes, 19 cremes de leite e 20 de patê de queijo. Nestas amostras foram encontradas 25 espécies de *B. cereus* com potencial enterotoxigênico isolados nos três grupos de alimentos estudados (MARTINS, KABUKI, KUAYE, 2009). Outras 120 amostras de leite, sendo 30 de leite em pó, 30 de leite cru, 30 de leite pasteurizado e 30 de leite longe vida (UHT), foram analisadas de seis diferentes marcas e 58,3% apresentaram *B. cereus* (REZENDE-LAGO *et al.* 2007).

Este micro-organismo também já foi encontrado em queijo de minas e em plantas de processamento de ricota em ricota em um laticínio localizado em Minas Gerais (MARTINS, KABUKI, KUAYE, 2009; FERNANDES *et al.*, 2014).

2.1.2. *Listeria monocytogenes*

São pequenos bastonetes não esporogênicos, anaeróbios facultativos, móveis, devido à presença de flagelos peritriquios, com movimentos característicos que auxiliam na sua identificação. São produtores de catalase, fermentam glicose com produção de ácido láctico sem produção de gás e não produzem oxidase (BORGES *et al.* 2009; FRANCO, LANDGRAF, 2002;). Multiplicam-se em faixa de temperatura de 0°C a 45°C, embora tenham multiplicação ótima em 37°C. Geralmente são inativados em temperaturas superiores a 50°C (DOYLE, BEAUCHEAT, 2007; TRABULSI, ALTERTHUM 2005). Seu crescimento ocorre em uma faixa de pH que varia entre 5,6 até 9,6 e toleram altas concentrações de sal (DOYLE, BEAUCHEAT, 2007).

Fatores como temperatura, umidade relativa e características das superfícies de contato influenciam na sobrevivência desta bactéria, que costuma ser prolongada em aço inoxidável (WONG, 1998). Apesar das cepas de *L. monocytogenes* serem destruídas por processo de pasteurização adequado, pode ocorrer contaminação pós-pasteurização, favorecendo a multiplicação das cepas no produto final, principalmente quando armazenado sob temperatura de refrigeração, já que se trata de um micro-organismo psicrotrófico (JAY, 2008; DOYLE, BEAUCHEAT, 2007; FRANCO, LANDGRAF, 2002).

L. monocytogenes pode ser isolada de diversas fontes ambientais, sendo encontrada no solo, silagem, fezes de animais, esgoto e água. Frequentemente são associadas aos alimentos frescos de origem animal e vegetal, sendo comum a presença deste patógeno em ambientes de processamentos, como por exemplo, em leite fluido, queijo, iogurte, sorvete, salsicha, chucrutaría, carne de aves e frutos do mar (JAY 2008; DOYLE, BEAUCHEAT, 2007). O abuso da temperatura e a dificuldade em manter a cadeia de frio são considerados fatores críticos que propiciam a permanência e

crescimento da *L. monocytogenes* em alimentos (MONTANEZ-IZQUIERDO *et al.*, 2012).

A legislação brasileira estabelece ausência deste patógeno em 25g de amostra de queijo (BRASIL, 2001), porém vários trabalhos já relataram a presença deste micro-organismo em produtos de origem láctea, tais como ricotas (ESPER, KABUKI, KUAYE, 2011), queijo minas frescal, queijo coalho e também em leite (BORGES *et al.*, 2009).

Possuem capacidade para se fixar em diferentes superfícies e equipamentos desde o processamento, armazenamento e transporte, podendo ser carregadas para a produção através dos manipuladores, do sistema de ventilação, água empoçada ou condensada, utensílios e equipamentos contaminados (MONTANEZ-IZQUIERDO *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2009; DOYLE, BEAUCHEAT, 2007; KABUKI, 2004; SHARMA, ANAND, 2002; LERICHE, CARPENTIER, 2000; WIEDMANN *et al.*, 2000). Podem ainda estar presentes no sistema de pisos e drenos, sistemas de transporte, em tanque de recepção de leite cru e caixa plástica de transporte de leite (BORGES *et al.*, 2009; DOYLE, BEAUCHEAT, 2007; FIGUEIREDO, 2000; COTTON, WHITE 1992; NELSON, 1990; COX *et al.*, 1989).

Este patógeno está relacionado a vários surtos. Aproximadamente 1.600 pessoas ficam doentes e 260 mortes são registradas anualmente devido à listeriose nos Estados Unidos. No ano de 2012, 831 surtos de origem alimentar foram relatados. (CDC, 2013c; CDC 2014c). Este micro-organismo afeta principalmente mulheres grávidas, recém-nascidos, pessoas com idade superior a 65 anos ou com o sistema imunológico debilitado (CDC, 2013b, DOYLE, BEAUCHEAT, 2007). A listeriose pode apresentar as seguintes manifestações clínicas: septicemia, aborto, endocardite, conjuntivite, meningite entre outras (FRANCO, LANDGRAF, 2002).

Surtos de listeriose já foram associados a diferentes veículos de contaminação como melão, aipo, brotos, patê, linguiça de porco, salada de repolho, carne de frango, camarão, carne de porco e principalmente produtos oriundos da indústria láctea, incluindo leite pasteurizado, achocolatado, manteiga e queijos de diferentes tipos, como o jalisco, azul, brie de Meaux, queijo estilo mexicano e de cabra (BORGES *et al.*, 2009; CDC, 2013b; JAY, 2008).

Um surto foi relatado associado ao consumo de queijo importado da Itália do tipo ricota nos Estados Unidos em 2012, onde vinte e duas pessoas foram infectadas em 13 estados diferentes, 20 foram hospitalizadas e 4 foram a óbitos. O produto foi recolhido e teve sua importação proibida até que a empresa pudesse provar que não haveria mais riscos de contaminação por *L. monocytogenes* (CDC, 2012). Outro surto por consumo de queijo ocorreu em 2013, também nos EUA, onde afetou 6 pessoas de diferentes estados: *Illinois, Indiana, Minnesota, Ohio e Texas*, sendo que ocorreu uma morte e um aborto espontâneo. O surto foi sanado e a FDA (*Food and Drug Administration*), juntamente com o Departamento de Agricultura americano passaram a trabalhar em ações corretivas junto à empresa antes de liberar a sua produção (CDC, 2013b).

Um surto recente foi registrado, onde 10 pessoas foram infectadas nos estados do Arizona, Kansas, Oklahoma e Texas (USA), no período de janeiro de 2014 e janeiro de 2015, com sorvetes da marca *Blue Bell Creameries*. Inspeções foram realizadas na fábrica e recalls foram divulgados, porém outras pessoas ainda podem ficar doentes com este produto, pois eles podem estar armazenados em freezers de consumidores que desconhecem o pedido de recolhimento (CDC, 2015b).

Quando aderidas às superfícies esta bactéria passa a adquirir novas propriedades com uma maior resistência aos desinfetantes (LERICHE, CARPENTIER, 2000; KUMAR, ANAND, 1998). Suspensões de *L. monocytogenes* aderidas em aço inoxidável, na presença de proteínas de carne e peixe,

alcançaram populações de 10^5 - 10^7 UFC/cm² em até 20 horas e apresentaram variada sensibilidade aos procedimentos químicos de limpeza e desinfecção (GRAM *et al.*, 2007).

2.1.3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus são cocos Gram positivos, em formas de cachos. São anaeróbios facultativos, mesófilos, produtores de enzimas como catalase, coagulase e DNase termorresistente. Tem reações negativas para oxidase, β -galactosidade e β -glucuronidase. O seu crescimento pode ocorrer em temperaturas entre 10°C e 45°C com temperatura ótima entre 30° a 37°C (VOS *et al.*, 2009; JAY, 2008).

Estão associados a patologias como furúnculos, acne, pneumonia, osteomielite, meningite, artrite, septicemia, toxemia (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004). São produtores de enterotoxinas, termoestáveis e resistentes às enzimas gastrointestinais, responsáveis por causarem a intoxicação alimentar estafilocócica. É considerado o segundo maior causador de DTAs no Brasil, sendo que muitos casos são sub-notificados (MARTINS, KABUKI, KUAYE, 2009; DOYLE, BEAUCHAT, 2007; BALABAN, RASOOLY, 2000).

Entre os principais reservatórios deste micro-organismo destacam-se o homem, o ar, água, solo, esgoto, além do próprio animal que pode ser a causa primária de contaminação do leite (FRANCO, LANDGRAF, 2002). A mastite estafilocócica da vaca leiteira, associada à mastite subclínica, é uma das preocupações da indústria láctea (JAYARÃO *et al.*, 2004; FRANCO, LANDGRAF, 2002).

A ausência de boas práticas de fabricação, falhas no controle do processamento térmico e no controle da temperatura de armazenamento são as principais falhas que podem levar à contaminação cruzada pós-pasteurização (MARTINS, KABUKI, KUAYE, 2009).

Vários alimentos estão associados à incidência deste patógeno, sendo comum a contaminação através do leite, principalmente cru, que apresenta características ideais de crescimento para este patógeno e derivados do leite, como queijo, cremes, tortas recheadas, batata, atum, frango, presunto e carnes cozidas (JAY, 2008; FRANCO, LANDGRAF 2002; ZECCONI, HAHN, 2000).

Vários surtos envolvendo este micro-organismo com produtos lácteos já foram relatados. Em 1998, 19 pessoas foram infectadas em uma escola no estado de Nova York nos Estados Unidos da América. Outro surto foi confirmado em Ohio (EUA) em 1998, onde 51 pessoas foram afetadas e em 2013, no estado do Hawaii (EUA), 139 pessoas foram contaminadas e 23 hospitalizadas e entre os alimentos suspeitos, estava um macarrão com queijo. No estado do Novo México (EUA), 3 pessoas foram hospitalizadas e um total de 20 adoeceram ao ingerir molhos preparado com leite não pasteurizado em um restaurante, no ano de 1998. Vários surtos envolvendo queijo, *milk shake*, pizza, sorvete, creme de coco, bolo e molho, foram registrados no ano de 2013 nos EUA (CDC, 2015a).

No Brasil, alguns surtos foram confirmados na região de São José do Rio Preto – SP entre os anos de 2001 e 2003, onde 52 pessoas foram afetadas. Os alimentos implicados foram produtos de confeitaria tanto doces como salgados (PERESI *et al.*, 2004). No estado do Paraná 492 surtos foram registrados entre os anos de 1978 até 2000 por *S. aureus* (VAN, HARACEMIV, MASSON, 2006).

Apesar do processo de pasteurização ser suficiente para eliminar este patógeno, as enterotoxinas são termoestáveis e conseguem manter sua atividade biológica mesmo após o processo de ultrapasteurização do leite, principalmente quando existem falhas no processo de higiene, seja durante manipulação, produção ou até nas etapas de comercialização. As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixo peso molecular e que permanecem ativas após a ingestão. (MARTINS, KABUKI, KUAYE, 2009; OMOE *et al.*, 2005; BLAIOTTA *et al.*, 2004; CULLER, 1997). Após a ingestão das enterotoxinas pré-formadas no alimento, os

sintomas das enfermidades podem aparecer em até 30 minutos, mas geralmente desenvolvem-se dentro do prazo de 1 até 6 horas. Entre os sintomas da gastroenterite são comuns náuseas, vômitos, dores de estômago e diarreia (CDC, 2013h; JAY, 2008). A presença deste micro-organismo em alimentos representa um perigo à saúde e indica que houve falha na qualidade higiênica da produção (MARTINS *et al.*, 2014).

S. aureus já foi isolado de diferentes produtos lácteos, como por exemplo: leite cru, leite pasteurizado, requeijão, iogurte, ricota, mozzarella e queijo duro de origem bovina, caprina, bubalina e ovina na Itália central (CARFORA *et al.*, 2015). Também já foram isolados do ambiente da ordenha, em amostras de leite, no tanque de armazenamento de leite, nos equipamentos da ordenha e em alguns utensílios como copos de teteiras, baldes, peneiras e nas mãos dos ordenhadores (LEE *et al.*, 2012). No Brasil, *Staphylococcus* spp. já foram detectados em amostras de creme de leite pasteurizado, patês, queijo Minas, queijo curado e ricota (MARTINS *et al.*, 2014; KOMATSU *et al.*, 2010; ESPER, 2006).

Staphylococcus, ao lado dos *Enterococcus* e *B. cereus* já foram encontrados em membrana de osmose reversa, promovendo contaminação cruzada em soro de leite (ANAND *et al.* 2014). Outras espécies como *Staphylococcus epidermidis* também já foram isolados de fazenda de vaca leiteira e laticínios e na presença de leite formaram biofilmes, principalmente quando exposto a outros compostos como a glicose e NaCl (MICHU *et al.*, 2011).

2.1.4. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus são micro-organismos anaeróbios facultativos, conhecidos por serem patógenos oportunistas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012), deteriorantes e indicadores (JAY, 2008). São caracterizados morfológicamente como cocos ovoides, gram-positivos, que se apresentam isolados, em pares ou

pequenas cadeias. Não esporulam e algumas espécies apresentam motilidade devido ao flagelo (VOS *et al.*, 2009).

Exigentes nutricionalmente, apresentam crescimento quimiorganotrófico. A temperatura de crescimento ideal ocorre entre 35°C até 45°C. Embora esses micro-organismos sejam considerados mesófilos, algumas cepas já tiveram o seu crescimento observado em temperaturas que variam entre 10°C até 45°C, deteriorando diversos produtos refrigerados. (VOS *et al.*, 2009; JAY, 2008). Quanto ao pH possuem crescimento ótimo em torno de 9,6 (FRANZ, HOLZAPFEL, STILES, 1999), mas resistem bem em pH extremos e variáveis, o que justifica a sua presença em diferentes alimentos (JAVED, MASUD, AIN, 2011).

Possuem metabolismo fermentativo e participam da homofermentação, produzindo ácido láctico a partir da glicose, além de produzirem ácidos a partir de açúcares como o arabinose, o eritritol, fucose, metilo α - d - xilosido e L – xilose. Apresentam resistência a 0,4% de sódio, 6,5% de NaCl e 40% de bile. Não produzem urease (VOS *et al.*, 2009).

Este micro-organismo é encontrado na microbiota do trato gastrointestinal de humanos, mamíferos, aves e insetos (GELSOMINO *et al.*, 2002). Existem 8 possíveis fontes de contaminação microbiológica em alimentos, incluindo o solo e água, plantas e derivados, utensílios de alimentos, manipuladores, rações animais, animais, ar e pó e o trato gastrointestinal. O trato gastrointestinal é considerado a fonte mais importante (JAY, 2008). Isso faz desse micro-organismo um perigo em potencial para a manipulação de alimentos.

As espécies mais frequentemente encontradas no homem são *E. faecalis* e a *E. faecium*. Essas espécies são conhecidas principalmente por serem responsáveis por infecções de feridas cirúrgicas e no trato urinário. Podem

também entrar pela corrente sanguínea através de procedimentos invasivos como os cateteres (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; TRABULSI, ALTERTHUM, 2005).

Os *Enterococcus*, bem como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria* são micro-organismos comuns em laticínios, devido a sua presença na microbiota do leite cru e também no úbere da vaca (JAVED, MASUD, AIN, 2011; JAY, 2008). Eles são encontrados no material e utensílios utilizados na ordenha podendo permanecer no leite cru, mantido em temperaturas de refrigeração por vários dias (JAY, 2008). Alcançam às indústrias de alimentos através da contaminação inicial do leite ou contaminação cruzada, favorecendo o desenvolvimento em derivados como fermentados, queijos artesanais elaborados a partir de leite cru de cabra, ovelha, búfalas e vacas (GELSOMINO, 2002).

São considerados probióticos e utilizadas como culturas iniciadoras no desenvolvimento do processo fermentativo em laticínios, contribuindo para a maturação e desenvolvimento de sabor nos produtos (GOMES *et al.*, 2008; FRANZ, HOLZAPFEL, STILES, 1999). Entre as espécies mais encontradas em queijos destacam-se as: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, e as mais raras que são as *E. hirae* e a espécie *E. casseliflavus* (OGIER, SERROR, 2008).

Além disso, algumas cepas ainda podem deteriorar queijo tipo suíço, promovendo manchas esbranquiçadas ou ainda impedir a fermentação do *Lactobacillus fermentum* e bactérias produtoras de ácidos propiônicos em determinados tipos de queijos, responsáveis pelo sabor do queijo, produzindo assim um produto de sabor pobre (LEDENBACH, MARSHALL, 2009).

A presença de bactérias do gênero *Enterococcus* na indústria láctea é uma preocupação (ROSADO, 2009), pois, além de ser um patógeno oportunista, causarem enfermidades humanas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012) na presença de uma superfície condicionada em tanques de processamento de leite, soro,

queijo entre outros produtos lácteos quando apresenta um sistema de higienização ineficaz contribuem para a formação de biofilmes (ROSADO, 2009).

Estes micro-organismos apresentam capacidade de adaptação em áreas do corpo ricas em nutrientes e pobres em oxigênio (ex: trato gastrointestinal, vagina e a cavidade oral). Apresentem alta resistência a antibióticos, como a vancomicina e são consideradas as principais causas de infecções nosocomiais, demonstrando sobrevivência maior quando comparado a outros enteropatógenos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; TRABULSI, ALTERTHUM, 2005). São mais tolerantes a níveis extremos de condições ambientais quando comparados a outras bactérias não esporuladas (JAVED, MASUD, AIN, 2011) tornando-o ameaça potencial à saúde do consumidor.

Poucos surtos associados a esta bactéria já foram relatados. Em 1993 ele causou um problema em seis pessoas, porém a fonte do alimento é desconhecida (CDC,1993). Outro surto envolvendo o consumo de molho branco em restaurante foi registrado em Ohio, em 1997, onde 7 pessoas foram afetadas. No ano de 2009, 13 pessoas foram afetadas no Arizona, EUA, ao ingerirem sanduíche submarino (CDC, 1997; CDC, 2013d).

Em um estudo realizado no norte da Itália, foram isolados *Enterococcus* de 42 amostras de alimentos retirados de um laticínio, entre elas, leite, fermento natural e queijos e em seguida foram comparados a 39 cepas isoladas de laboratórios clínicos, de amostras de fezes e urinas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados. Embora alguns gêneros isolados dos produtos alimentícios tenham apresentado potencial de virulência e resistência aos antibióticos, esses foram menores quando comparados com os isolados de humanos. Apesar disso, esse estudo recomenda que novas pesquisas sejam realizadas para conseguir comprovar se o uso em alimentos é seguro (CARIOLATO, ANDRIGHETTO, LOMBARDI, 2009).

Este micro-organismo já foi isolado a partir do processamento de ricota em placas de aço inoxidável (FERNANDES, KABUKI, KUAYE, 2015), do teto e das fezes da vaca, do leite cru, da máquina e do ambiente de ordenha de uma fazenda (KAGKLI *et al.*, 2007). No Brasil, uma pesquisa analisou 120 amostras de alimentos, incluindo produtos cárneos, leite cru, queijos e vegetais analisadas, sendo que 52,5% apresentaram *Enterococcus*, com maior incidência em produtos cárneos e queijos. Das culturas isoladas, 67,7% produziram sais biliares hidrolisados, 15,2% bacteriocina, 12,1% foram consideradas β -hemolítica e 18,2% produziram gelatinases. A presença da expressão de virulência e resistência aos antibióticos das cepas isoladas de produtos lácteos levantam dúvidas quanto à segurança dessas culturas em alimentos (GOMES *et al.*, 2008).

2.2. Biofilme

Biofilme pode ser definido como um consórcio ou comunidade de micro-organismos fixos em uma superfície, formados por uma ou várias espécies, embora os de múltiplas espécies predominem em diversos ambientes, envolvidos por uma matriz de exopolissacarídeos conhecida como EPS (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007; O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000).

Os biofilmes podem ser formados em condições estáticas (WINJMAN *et al.*, 2007). Essa estratégia de sobrevivência dos micro-organismos acontece em diferentes materiais como aço inoxidável, polipropileno, plástico, lã de vidro, borracha teflon, nylon, vidro e alumínio tendem a ser condicionada e tornar-se um ambiente propício para formação do biofilme (ANKITA, JITENDER, 2012; PAGEDAR, SINGH, 2012; BROOKS, FLINTE, 2008; KUMAR, ANAND, 1998).

Para ser considerado biofilme o número mínimo de células aderidas inicialmente variam de 10^3 UFC/cm² (RONNER, WONG, 1993), 10^5 UFC/cm² (WIRTANEN, HUSNARKM, MATTILA-SANDHOLM, 1996) a 10^7 UFC/cm² (ANDRADE, BRIDGEMAN, ZOTTOLA, 1998).

A remoção inadequada dos micro-organismos durante o processo de higienização leva a formação indesejada de uma camada de micro-organismos e seus produtos de decomposição, sobre uma superfície de contato com o meio líquido originando as incrustações biológicas em tubulações, equipamentos ou tanques e contribuindo para que ocorra o aumento do potencial de biotransferência dessas células e para a formação de biofilmes (WINJMAN *et al.*, 2007; KUMAR, ANAND, 1998).

Alguns fatores como a natureza dos substratos, das superfícies e dos micro-organismos interferem e favorecem a formação de incrustações biológicas, agindo em diferentes estágios da formação do biofilme. Natureza do substrato: Compostos orgânicos e inorgânicos, condições do fluxo, composição nutricional, presença de sais e pH. Característica das superfícies: hidrofobicidade, interfaces sólido-líquido, aspectos físico-químico, temperatura, osmolaridade, presença de ferro e oxigênio. Característica dos micro-organismos: Superfície da carga bacteriana, fase de crescimento, flagelos, fimbrias, interações entre as células, formação de esporos (ANAND *et al.*, 2014; DAT *et al.*, 2012 MARCHAND *et al.*, 2012; PAGEDAR, SINGH, 2012; ANKITA, JITENDER, 2012, O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000).

A formação do biofilme se dá por fases distintas, incluindo o condicionamento da superfície, a fixação bacteriana e o desenvolvimento das estruturas do biofilme até alcançar a sua maturidade (ANAND *et al.*, 2014). Tal formação pode ser considerada uma resposta ao estresse, principalmente na privação de nutrientes (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007).

A adesão do substrato pode ser passiva, quando é conduzida pela força da gravidade ou pela dinâmica dos fluidos. E pode ainda ser ativa quando influenciada pela superfície das células, incluindo as proteínas de superfície, os pili, as adesinas e pela própria síntese de polissacarídeos (CHMIELEWSKI, FRANK, 2003).

No início, as células planctônicas aderem a uma superfície e com o tempo elas passam a se organizar em grupos, sendo denominadas sésseis. Nessa etapa elas estão associadas ao substrato e possuem pouco poder de locomoção (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; ANDRADE, AJAO, ZOTTOLA, 1998). Os micro-organismos sofrem mudanças profundas durante a transição da fase planctônicas para sésseis, onde formam uma complexa comunidade (O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000).

O processo de formação é dinâmico e ocorre em duas fases, a reversível e irreversível. A reversível é a adesão inicial dos micro-organismos em um substrato com condições suficientes para viabilizar o crescimento, gradualmente. No início da formação do biofilme, poucas células planctônicas aderem a superfície, produzindo pouca quantidade de exopolissacarídeos. Essa fase reversível pode ser removida por lavagem. As forças que atuam nessa etapa são as forças de Van der Waals, eletrostática e a interação hidrofóbica. (HAMID *et al.*, 2013; WINJMAN *et al.*, 2007; CHMIELEWSKI, FRANK, 2003; KUMAR, ANAND, 1998).

Durante a transição entre a fase reversível e irreversível ocorre a formação das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que são conjuntos de polímeros biossintéticos que incluem substitutos ou não de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007).

Os (EPS), geralmente compostos por 15% de células e 85% de volume da matriz, favorecem a colonização e a retenção de detritos orgânicos e inorgânicos (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007; SCHENEIDER, 2007; CHMIELEWSKI, FRANK, 2003). A medida que os biofilmes amadurecem e multiplicam-se, são formadas as microcolônias, responsáveis por influenciar a formação de canais de água, transporte de nutrientes, oxigênio dissolvido e antimicrobianos para as células. Tais trocas propiciam o crescimento destes biofilmes, contribuindo para características como espessura e complexidade. Esta

é a fase irreversível, que pode levar até 10 dias para se formar e é influenciada por força de curto alcance como dipolo-dipolo, hidrogênio, ligações iônicas e covalentes. Nessa etapa, as forças repulsivas evitam o contato direto dos micro-organismos com o substrato. Só a lavagem não é suficiente, em alguns casos só é possível remover o biofilme através de uma raspagem do material (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007; CHMIELEWSKI, FRANK, 2003).

Os genes responsáveis pela expressão das proteínas de fixação de superfície e produção de EPS, no processo fisiológico durante a fixação irreversível são ativados em respostas aos estímulos externos, incluindo a densidade populacional, o estresse e a limitação de nutrientes (CHMIELEWSKI, FRANK, 2003).

Quando envolta pela matriz de EPS, essas camadas externas do biofilme funcionam como uma proteção, protegendo as células do interior contra influências adversas do ambiente, contribuindo para o aumento da resistência aos agentes de limpeza e de substâncias antimicrobianas (WINJMAN *et al.*, 2007, O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000).

Além disso, a baixa taxa de crescimento das células e os padrões de expressões dos genes específicos para biofilmes também contribuem para que essa resistência aumente (WINJMAN *et al.*, 2007).

O transporte de nutrientes e o grau de adsorção são extremamente importantes para o biofilme, e geralmente acontece por difusão e em alguns casos por fluxo turbulento do líquido. A transferência dos nutrientes é mais rápida quando o biofilme está na fase aquosa, porém depende também do nível de nutrientes e dos micro-organismos envolvidos (KUMAR, ANAND, 1998).

Além do condicionamento das superfícies, outros fatores como a hidrofobicidade das superfícies dos materiais, o transporte de massa, a energia livre da superfície, as cargas eletrostáticas, a rugosidade e a micro topografia da

superfície, também estão envolvidos e influenciam o processo de fixação inicial dos micro-organismos em biofilmes (BROOKS, FLINT 2008; PALMER, FLINT, BROOKS 2007).

Na fase final do biofilme, quando ele está maduro, algumas células podem separar-se devido a fatores extrínsecos como cisalhamento, descamação, erosão ou até por mudanças na disponibilidade de nutrientes ou parada súbita de fluxo. Esse deslocamento também pode ser causado por fatores e mecanismos provenientes do próprio biofilme (WINJMAN *et al.*, 2007). Quando isso ocorre, os micro-organismos podem permanecer vivos longe do substrato por um longo período (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007).

A separação (descolamento do biofilme) é formada por três etapas, incluindo a erosão, abrasão e descamação. As forças de cisalhamento e dos fluídos vão influenciar na erosão. Já quando ocorre colisão de partículas, podemos associar a abrasão. Na descamação há uma separação contínua das células individuais ou clusters, afetando a superfície dos biofilmes (MARCHAND *et al.*, 2012).

Quando um biofilme apresenta um padrão de comportamento caracterizado por processo de crescimento intercalado por desprendimento das células, esse processo é conhecido por ser um mecanismo de dispersão. Acredita-se que o biofilme utiliza esse sistema para manter o equilíbrio em um processo programado. Quando as microcolônias são rompidas, as células planctônicas favorecem a geração de um novo ciclo de formação de biofilmes em outros locais (STAPPER *et al.*, 2004, STOODLEY *et al.*, 2001; COSTERTON *et al.*, 1999).

Os micro-organismos em forma de biofilme quando em ambiente adequado favorece a sinalização célula a célula (*Quorum Sensing*). A via de sinalização acontece através de compostos de baixo peso molecular que funciona como um sensor. A presença, a concentração e o tipo de molécula dependem da densidade populacional e variam de acordo com as interações. O mecanismo

de comunicação célula-célula funciona como um sincronizador dos genes de expressão em resposta a densidade da população celular. Alguns exemplos de auto indutor envolvidos nesse processo em bactérias gram-positivas, são aminoácidos e peptídeos curtos modificados (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007; SOLANO *et al.* 2014).

Compreender os parâmetros envolvidos na morfologia, no comportamento e interação dos micro-organismos, bem como no desenvolvimento do biofilme, e ainda na composição das superfícies de contato na indústria de alimentos, torna possível entender os mecanismos de regulação (*quorum sensing*), que influenciam o aumento ou redução do potencial de adesão nas superfícies de contatos, contribuindo para um controle eficaz de adesão, bem como dos tratamentos (HAMID *et al.*, 2013; DAT *et al.*, 2012; O'TOOLE , KAPLAN, KOLTER, 2000).

2.3. Biofilme na indústria de alimentos

O estudo das interações entre bactérias e superfícies do processamento de alimentos é importante, pois ajuda a fornecer medidas eficazes para prevenir a formação e remoção dos biofilmes. Mesmo efetuando uma limpeza aceitável os micro-organismos possuem a capacidade de sobreviver em equipamentos por um período prolongado dependendo da quantidade da natureza residual, da temperatura e de outros fatores como a umidade relativa (WONG, 1998).

Após a formação, o biofilme representa um desafio e uma grande preocupação para a indústria de alimentos, conduzindo a perdas econômicas e influenciando na segurança da qualidade do produto final (HAMID *et al.*, 2013; WINJMAN *et al.*, 2007).

Nas indústrias de alimentos, principalmente nas áreas de processamento e armazenamento, os substratos, geralmente sólidos orgânicos e inorgânicos presentes na corrente de alimentação, são transportados e adsorvidos pelas

superfícies de contatos, dando origem as superfícies condicionadas. Essas películas com alta concentração de nutrientes são propícias ao crescimento dos micro-organismos e formação dos biofilmes (ANAND *et al.*, 2014; PALMER, FLINT, BROOKS, 2007; KUMAR, ANAND, 1998).

Alguns equipamentos nas indústrias de alimentos possuem áreas críticas devido a sua aparência irregular e a presença de sulcos, fissuras, fendas, áreas sem saídas, articulações e válvulas. Essas características criam um ambiente propício para a formação de biofilme. Alguns micro-organismos sobrevivem às forças de cisalhamento empregados em métodos mecânicos de limpeza, ficando aprisionado nessas fendas e desenvolvem-se mesmo sobre a limitação de nutrientes (DAT *et al.*, 2012; PAGEDAR, SINGH, 2012; KUMAR, ANAND, 1998).

Os baixos níveis de nutrientes reforçam a esporulação dos micro-organismos presentes no biofilme, impactando no aumento do processo de aderência nas superfícies de contato com os alimentos e a tolerância durante os processos de limpeza e higienização (PAGEDAR, SINGH, 2012).

O biofilme, bem como os esporos presentes influenciam na transferência de calor e na eficiência das operações, pois ficam retidos durante o processamento do leite em trocadores de calor. Quando presentes no sistema de filtração, reduzem a permeabilidade do material (ANAND *et al.*, 2014; KUMAR, ANAND, 1998).

Dependendo das condições de cultura e da cepa, os esporos podem constituir em até 90% das contagens totais do biofilme, funcionando como um “ninho” de esporos que posteriormente serão liberados em ambientes de produção de alimentos. Os esporos são hidrofóbicos e altamente resistentes aos estresses, logo eles aderem com facilidade em diferentes equipamentos e materiais no processamento de alimentos (WINJMAN *et al.*; 2007).

A formação do biofilme favorece a produção indesejável de produtos de decomposição, que agem impedindo o fluxo de calor, aumentando a resistência ao atrito do fluido na superfície e a taxa de corrosão, provocando a deterioração e falhas dos equipamentos, destruindo as superfícies de contato. Além disso, os desprendimentos das células do biofilme resultam em contaminação pós-processamento (NGUYEN, YANG, YUK, 2014; HAMID *et al.*, 2013; DAT *et al.*, 2012; WINJMAN *et al.*, 2007; KUMAR, ANAND, 1998).

O aumento da frequência da limpeza é uma das únicas opções para que as indústrias processadoras de leites e derivados possam reduzir os problemas com biofilmes (NGUYEN, YANG, YUK, 2014; FLINT, BREMER, BROOKS 1997). É comum que as bactérias presentes em biofilmes apresentem resistência aos tratamentos antimicrobianos e aos procedimentos de sanitização quando comparados com células planctônicas (NGUYEN, YANG, YUK, 2014).

Os biofilmes bacterianos de patógenos afetam principalmente alimentos frescos, produtos lácteos e ricos em proteínas como aves e carnes (CHEN; ROSSMAN; PAWAR, 2007). Dos produtos derivados de leite, os queijos são uma preocupação, visto que são consumidos sem aquecimento. Além disso, longos períodos de armazenagem sob refrigeração podem beneficiar o crescimento de micro-organismos psicotróficos como a espécie *L. monocytogenes* (BARANCELLI, 2010).

Há mais de seis décadas a indústria láctea utiliza o aço inoxidável em suas instalações devido às características do material atenderem aos requisitos básicos exigidos na legislação e favorecerem o processo de produção. O aço inoxidável possibilita um ótimo coeficiente de expansão, oferecendo boa condutividade térmica, são resistentes às corrosões alcalinas e ácidas provenientes da higienização, além de ser neutro do ponto de vista sensorial, contribuindo para aumentar a segurança do produto final e evitando perdas econômicas (MARCHAND *et al.*, 2012).

Há vários relatos de biofilmes encontrados em diferentes etapas e equipamentos de processamento do leite e seus derivados, incluindo em sistemas de água de lavagem, na ordenha, processamento de leite, fábricas de queijos e produção de sorvetes. A presença de biofilmes foi registrada em tanques, silos de leite, trocadores de calor, torres de resfriamento do sistema de pasteurização, sistemas de filtração, ultrafiltração e em sistema de osmose reversa (ANAND *et al.*, 2014; MARCHAND *et al.* 2012, PAGEDAR, SINGH, 2012; KUMAR, ANAND, 1998).

Nos equipamentos onde a superfície permanece em contato direto com o fluxo de leite ou soro de leite, a adsorção de proteínas favorece a formação de superfícies condicionadas, aumentando a fixação e aderência dos micro-organismos, inclusive em superfícies de aço inoxidável (ANAND *et al.*, 2014; KUMAR, ANAND, 1998). O condicionamento é rápido e contínuo, podendo ter início após 5 ou 10 segundos após a entrada do fluído na superfície limpa. Quando as proteínas do soro de leite estão expostas a uma temperatura superior a 65°C ocorre a desnaturação protéica, favorecendo o condicionamento através da aderência rápida dos micro-organismos nas superfícies (MARCHAND *et al.*, 2012).

É controverso o comportamento de determinados micro-organismos em aço inoxidável na presença de componentes lácteos. Alguns afirmam que as proteínas inibem a formação de biofilme, alterando a fixação (PARKAR *et al.*, 2001; BARNERS *et al.*, 1999; WONG, 1998). Outros autores provaram o contrário, que alguns micro-organismos demonstram maior capacidade de fixação na presença de proteína de soro de leite em aço inoxidável (SPEERS, GILMOUR, 1985).

Alguns experimentos usando superfícies de aço inoxidável condicionada com leite desnatado comprovaram que houve redução de fixação de células vegetativas e esporos de *Bacillus* termofílicos (PARKAR *et al.*, 2001) e de *S.*

aureus, *L. monocytogenes* e *Serratia marcescens* (BARNERS *et al.*, 1999). Uma provável explicação para essa redução seria a presença de proteínas como a caseína e a β -lactoglobulina que quando presentes em fases fluídas atuam como competidoras por sítios de ligação na superfície do inoxidável, reduzindo a capacidade de adesão das bactérias. Possivelmente a inibição está relacionada com a repulsão entre as cargas eletronegativas das proteínas do leite e das células bacterianas (WONG, 1998).

Também o oposto foi encontrando quando observado o desenvolvimento de biofilme em superfícies de aço inoxidável e de borracha, condicionadas com proteínas do soro de leite e lactose, onde houve um aumento da fixação de determinados micro-organismos como as *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Flavobacterium* spp. Possivelmente uma solução com maior viscosidade pode favorecer a retenção e fixação dos micro-organismos (SPEERS, GILMOUR, 1985).

Para o controle dos biofilmes o primeiro passo importante é a limpeza e sanitização de equipamentos (FORSYTHE; HAYES, 1998), sendo necessária para eliminação de detritos de alimentos e resíduos que contribuem para a fixação dos micro-organismos em diferentes superfícies (SIMÕES *et al.*, 2010). Equipamentos que possuem superfícies em contato direto com os alimentos devem ser limpos diversas vezes ao dia, já as superfícies ambientais como as paredes, semanalmente. (GIBSON *et al.*, 1999). O processo *cleaning-in-place* (CIP) caracterizado como uma limpeza completa na planta de processamento é utilizado como controle de biofilme em laticínios (BREMER *et al.*, 2006). A presença de biofilmes na indústria de alimentos impacta diretamente no prazo de validade dos produtos (ZOTTOLA, SASAHARA, 1994).

2.4. Biofilmes multiespécies

Em biofilmes de multiespécies as células justapostas favorecem uma cooperação metabólica. Assim, acredita-se que haja uma troca benéfica dos substratos e remoção dos produtos finais. Essas possíveis cooperações são sustentadas pela fase estacionária das células. Uma célula individual consegue viver em um micro nicho dentro do biofilme, onde os nutrientes são fornecidos por células vizinhas por difusão. Alguns produtos como as substâncias antagonistas são afastadas por barreiras pelo mesmo processo de difusão. Esse nível de estrutura organizacional do metabolismo do biofilme explica a sua eficiência e a sua resistência aos agentes antibacterianos (COSTERTON *et al.*, 1994).

As interações entre as espécies microbianas e o meio no qual estão inseridos podem influenciar a formação do EPS. Alguns trabalhos demonstraram que na presença do soro de leite a produção de EPS é menor (LERICHE, CARPENTIER, 2000; ANAND, 1998). Já quando os biofilmes são formados por espécies mistas é comum que sejam mais espessos e mais estáveis quando comparados com uma única espécie. Uma espécie produz e contribui para melhorar a estabilidade das outras espécies dentro do biofilme (KUMAR, ANAND, 1998).

As espécies patogênicas que formam biofilmes são de grande interesse por diversos grupos de pesquisa para manter o controle da segurança dos alimentos (ZOTTOLA, SASAHARA, 1994). A interação entre as espécies é considerada um fator de virulência (ALMEIDA, OLIVER, 2001; HENSEN *et al.*, 2000), pois essas bactérias tornam-se difíceis de serem eliminadas (MOSTELLER, BISHOP, 2003).

Geralmente a *L. monocytogenes* cultivada sozinha em caldo de triptona soja (TSB) e ou infusão de cérebro e coração (BHI) não tem potencial elevado para formar biofilme e microcolônias em superfícies de contato como o aço inoxidável (ZOTTOLA, 1988). Na presença de *Bacillus* sp. CCL9 e *Pseudomonas*

fluorescens, *L. monocytogenes* teve uma redução de até 3 log UFC/cm², quando comparado com biofilme monoespécie. Na presença de *Kokuria varians* CCL 73, *Staphylococcus capitis* CCL 54, *Stenotrophomonas maltophilia* CCL 47 e *Comamonas testosteroni* CCL 24 sofreu o inverso e houve um aumento de 0,5 ciclo de log, até 1 ciclo log UFC/cm² no crescimento deste micro-organismos (CARPENTIER, CHASSAING, 2004).

Um aumento da colonização por *L. monocytogenes* e *Listeria innocua* também foi relatado quando na presença de *Pseudomonas* spp. (BOURION E CERF, 1996) e de *Flavobacterium* sp. (BREMER *et al.*, 2001). Já na presença de *Staphylococcus xylosus* e *Pseudomonas fragi* houve uma redução quando comparado com monocultura (NORWOOD, GILMOUR, 2000).

Duas cepas de *L. monocytogenes* tiveram as contagens reduzidas na presença do *Staphylococcus sciuri* em aço inoxidável, onde foi observado maior produção de substâncias extracelulares como uma possível causa da redução da adesão. Maior proporção de células na fase planctônicas, em culturas mistas, foi observada, sugerindo então que o EPS produzido pelo *Staphylococcus sciuri* poderia modificar o equilíbrio da fase (LERICHE, CARPENTIER, 2000).

A competição natural entre os micro-organismos pode impedir a colonização dos mesmos em instalações e superfícies de equipamentos em laticínios (LERICHE, CARPENTIER, 2000). O estudo das interações entre as espécies é importante para avaliar as chances de encontrar cepas que contribuam para aumentar ou reduzir determinados micro-organismos (CARPENTIER, CHASSAING, 2004). Portanto a exclusão competitiva é uma estratégia usada para inativar biofilmes de patógenos em ambientes de processamento alimentar (KIM *et al.*, 2013).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi avaliar a formação de biofilmes multiespécies de patógenos gram-positivos isolados de produtos lácteos, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos.

3.1. Objetivos específicos

- ✓ Promover a formação do biofilme monoespécie de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogens* e *Staphylococcus aureus* sobre superfície de aço inoxidável.
- ✓ Promover a formação do biofilme multiespécies de *E. faecalis*, *B. cereus*, *L. monocytogens* e *S. aureus* em superfície de aço inoxidável
- ✓ Verificar o comportamento dos patógenos *E. faecalis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S.aureus* na formação de biofilmes monoespécie e multiespécies em aço inoxidável em diferentes substratos (caldo infusão de cérebro e coração BHI, soro de leite e leite desnatado).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

4.1. Cepas bacterianas utilizadas

Todas as culturas utilizadas nos experimentos (Tabela 1) foram previamente isoladas de produtos lácteos e cedidas pelo Laboratório de Higiene, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.

Tabela 1 – Cepas de origem láctea utilizadas para preparação do inóculo na formação do biofilmes monoespécie e multiespécies.

Cepas utilizadas	Codificação	Origem	Referência
<i>Bacillus cereus</i>	M1-102	Patê de queijo	MARTINS, KABUKI, KUAYE, 2009.
<i>Bacillus cereus</i>	K1B-052	Queijo minas frescal	KABUKI, SOUZA, KUAYE, 2008.
<i>Bacillus cereus</i>	R1-070	Queijo minas frescal	ROCHA, 2004.
<i>Listeria monocytogenes</i>	C1-023	Queijo minas frescal	CARVALHO, VIOTTO, KUAYE, 2005.
<i>Listeria monocytogenes</i>	C1-029	Queijo coalho	CARVALHO, VIOTTO, KUAYE, 2005.
<i>Listeria monocytogenes</i>	E1-010	Ricota	ESPER, KABUKI, KUAYE 2011.
<i>Staphylococcus aureus</i>	C1-003	Queijo minas frescal	CARVALHO, VIOTTO, KUAYE, 2005.
<i>Staphylococcus aureus</i>	C1-009	Queijo minas frescal	CARVALHO, VIOTTO, KUAYE, 2005.
<i>Staphylococcus aureus</i>	E1-090	Ricota	ESPER, KABUKI, KUAYE 2011.
<i>Enterococcus faecalis</i>	E-130	Embalagem de queijo	FERNANDES, KABUKI, KUAYE, 2015.
<i>Enterococcus faecalis</i>	E-113	Soro de leite	FERNANDES, KABUKI, KUAYE, 2015.
<i>Enterococcus faecalis</i>	E-87	Ricota	FERNANDES, KABUKI, KUAYE, 2015.

4.2. Preparo da suspensão de culturas

As culturas, mantidas sob refrigeração a 4°C, foram reativadas duas vezes consecutivamente em Caldo BHI (Infusão de Cérebro Coração; Difco) e incubados a 35°C por 24 horas. Uma mistura de 2 mL de cada cepa foi utilizada para o preparo do inóculo. Em seguida, 1 mL de cada mistura, foi submetida a

diluição seriada e foi inserido uma quantidade equivalente a concentração de 10^3 UFC/mL no substrato de cada ensaio, para promover os biofilmes, nos cupons de aço inoxidável. A padronização da densidade óptica das culturas foi ajustada pelo padrão de *McFarland* em fotômetro portátil (Densimat 99234, BioMerieux), para o controle sobre a turbidez da preparação do inoculo.

4.3. Preparo dos cupons de aço inoxidável

Os cupons de aço inoxidável AISI 304 com 0,366 μ m de rugosidade dentro do padrão de acabamento número 4, determinados pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM) e considerados adequados para utilização nas indústrias de alimentos, foram usados na dimensão de 10 x 10 x 1 mm. Os cupons foram limpos utilizando-se esponja, água e detergente neutro, e após enxágue em água destilada foram imersos em etanol 70% por 1 hora, seguido de um novo enxágue em água destilada, secagem e esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos (ROSADO, 2009; PARIZZI, *et al.*, 2004).

4.4. Escolha do meio de cultura

Foram realizados testes com vários meios de culturas para conseguir um meio de cultura seletivo, ou seja, que fosse possível contar o micro-organismo alvo e inibir os demais nos ensaios de formação de biofilme multiespécies. A escolha seguiu a sugestão das metodologias tradicionais, para verificar a capacidade do meio em promover o isolamento seletivo. Os inoculos dos micro-organismos foram preparados e 0,1 μ L foram semeados em diferentes agares seletivos. Foram testados os seguintes meios: Agar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP, Difco); Agar KF *Streptococcus* (KF, Difco); Agar Palcam (PAL, Difco); Ágar Cloreto de lítiofeniletanol-moxalactam (LPM, Difco); Agar Baird Parker (BD, Difco); Agar Manitol Sal (MSA), de acordo com a literatura, conforme apresentado (Tabela 2).

Tabela 2 - Meios de culturas seletivos testados para cada micro-organismo.

Micro-organismo	Meio	Referência
<i>Bacillus cereus</i>	MYP*	MOSSE , KOOPMAN, JONGERIUS, 1996
<i>Enterococcus faecalis</i>	KF*	APHA, 2001
<i>Listeria monocytogenes</i>	PAL*; LPM*	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2003 LOESSNER <i>et al.</i> , 1998
<i>Staphylococcus aureus</i>	BP*; MSA*	BAIRD-PARKER, 1962 DAVIS, FARRAH, WILKIE, 2006 RYSER, DONNELLY, 2001

*MYP = Agar Manitol Gema de Ovo Polimixina; KF = Agar KF *Streptococcus*; PAL = Agar Palcam; LPM = Ágar Cloreto de lítiofeniletanol-moxalactam; BP = Agar Baird Parker; MSA = Agar Manitol Sal.

Os meios de cultura escolhidos para esse teste e sua composição foram o MYP, KF, BD, LPM, Palcam e o MSA, as especificações deles foram inseridas no anexo 1 identificado como Meios de cultura.

4.5. Formação de Biofilmes Monoespécie e Multiespécies em diferentes substratos

4.5.1. Ensaios

Para cada grupo foram utilizados 14 cupons, sendo que estes foram divididos inicialmente em dois subgrupos de 7. Cada grupo ficou imerso em 60 mL de substrato, codificado de acordo com o ensaio, onde o ensaio 1 usou o caldo BHI, o ensaio 2 o soro de leite e o ensaio 3 o leite desnatado estéril. Em seguida foram mantidos em temperaturas de 25°C por 10 dias. No 4° e 7° dia de incubação, os substratos foram trocados para simular um meio de produção em constante processamento e impedir que o pH reduza demais a ponto de eliminar os micro-organismos impedindo a formação do biofilme. Cada ensaio foi composto por 5 grupos, designado como ilustrado no fluxograma apresentado na Figura 1.

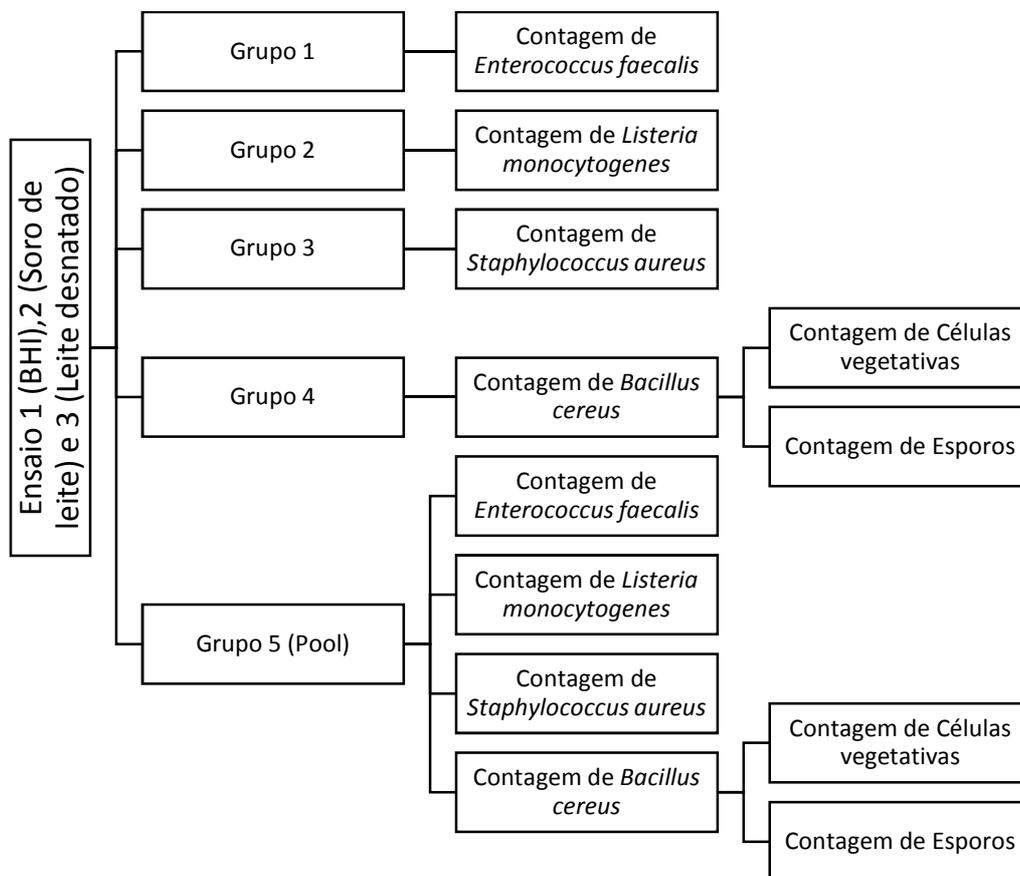


Figura 1 - Fluxograma dos ensaios 1 (BHI), ensaio 2 (Soro de Leite) e ensaio 3 (Leite desnatado).

Ensaio 1: Formação de biofilme em BHI: Os cupons foram previamente esterilizados, conforme explicado anteriormente, e divididos em 5 grupos: Grupo 1 (G1): suspensão de 10^3 UFC/mL de *Enterococcus faecalis* em caldo BHI; Grupo 2 (G2) suspensão de 10^3 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* em caldo BHI; Grupo 3 (G3) : suspensão de 10^3 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* em caldo BHI; Grupo 4 (G4): suspensão de 10^3 UFC/mL de *Bacillus cereus* em caldo BHI; Grupo 5 (G5) Suspensão em caldo BHI contendo 10^3 UFC/mL do Pool de *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus*.

Ensaio 2: Formação de biofilme na presença do soro de leite: O ensaio 2 seguiu a mesma metodologia do ensaio 1, porém o substrato utilizado foi

o soro de leite (Allibra) reconstituído 5g a cada 100mL de água destilada e esterilizado a 121°C por 10 minutos.

Ensaio 3 : Formação de biofilme na presença de leite desnatado: O ensaio 3 seguiu a mesma metodologia do ensaio 1 e 2 e, porém, o meio utilizado foi o leite desnatado UHT (Molico), adquirido em comércio local na cidade de Campinas no estado de São Paulo.

A adesão e a formação do biofilme em superfície de aço inoxidável, foram obtidas pela técnica de contagem padrão em placas, expressos em log UFC.cm⁻², em função do tempo (6h, 24h (1ºdia), 48h (2ºdia), 96h (4ºdia), 168h (7ºdia) e 240h (10ºdia) em diferentes substratos (B HI, soro de leite e leite desnatado) e na temperatura de incubação de 25°C. Foi realizado a medição do pH com fita colorimétrica antes de cada contagem.

Os ensaios de biofilme foram realizados em triplicata.

4.6. Contagem de micro-organismos

A adesão e a formação dos biofilmes foram analisadas através de contagem em placas onde dois cupons de cada grupo foram retirados para contagem. Os cupons foram analisados após 6 horas, 24 horas (1 dia), 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias), 168 horas (7 dias) e 240 horas (10 dias) de incubação a 25°C. No dia da contagem o substrato teve o seu pH medido com fita colorimétrica.

O cupom retirado para contagem foi transferido com a ajuda de uma pinça estéril para um tubo contendo 10 mL de solução de peptona a 0,1% por um minuto sem agitação para remoção das células planctônicas e em seguida transferido para 5 mL de solução salina peptonada (NaCl 0,85% e peptona 0,1%) submetidos à agitação em vórtex na velocidade máxima por 2 minutos (ROSADO,2009).

Após a realização de diluições decimais, uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi inoculada em ágar MYP, KF, MSA e LPM, respectivamente para contagens de *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período as colônias foram contadas, com ajuda de contador de colônia.

Em seguida foi realizado a contagem de esporos. Após a retirada das células planctônicas, os cupons foram submetidos a choque térmico de 80°C por 12 minutos, seguido de plaqueamento em *Plate Count Agar* (PCA) suplementado com 0,1% de amido solúvel e incubados a 35°C por 48 horas (FRANK E YOUSEF, 2004). A contagem de esporos foi realizada a partir de 48 horas para os Grupo 4 e Grupo 5 de todos os ensaios com ajuda de contador de colônia.

4.7. Análise Estatística

Os procedimentos utilizados para comparar as amostras foram realizados através da Análise de Variância (ANOVA). As diferenças significativas ao nível de 95% entre os tratamentos foram analisadas através do teste de Tukey. Para análise de estatística foi utilizado o Software STATISTICA versão 8.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Escolha do meio de cultura

A escolha do meio de cultura é importante para o crescimento dos micro-organismos. Nesse trabalho utilizou-se 4 espécies de micro-organismos: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, sendo utilizados 3 cepas de cada micro-organismo. No biofilme multiespécies, todas as cepas foram misturadas formando um *Pool*, sendo necessário, portanto, realizar contagens de cada espécie levando em consideração os agentes seletivos presentes no meio para inibir o desenvolvimento das outras espécies.

Tabela 3. Meios seletivos testados para contagem das cepas de micro-organismos

Cepas	MYP*	KF*	BP*	Palcam*	MSA*	LPM*
<i>L. monocytogenes</i>	Colônias	Não	Colônias	Colônias	Não	Colônias
C1-023	amarelas	creceu	pretas	pretas	creceu	creme
<i>L. monocytogenes</i>	Colônias	Não	Colônias	Colônias	Não	Colônias
C1-029	amarelas	creceu	pretas	pretas	creceu	creme
<i>L. monocytogenes</i>	Colônias	Não	Colônias	Colônias	Não	Colônias
E1-010	amarelas	creceu	pretas	pretas	creceu	creme
<i>S. aureus</i> C1-003	Colônias	Não	Colônias	Colônias	Colônias	Não
	amarelas	creceu	pretas	laranja	amarelas	creceu
<i>S. aureus</i> C1-009	Colônias	Não	Colônias	Colônias	Colônias	Não
	amarelas	creceu	pretas	laranja	amarelas	creceu
<i>S. aureus</i> E1-090	Colônias	Não	Colônias	Colônias	Colônias	Não
	amarelas	creceu	pretas	laranja	amarelas	creceu
<i>E. faecalis</i> E-87	Colônias	Colônias	Colônias	Não	Não	Não
	amarelas	vermelhas	pretas	creceu	creceu	creceu
<i>E. faecalis</i> E-113	Colônias	Colônias	Colônias	Não	Não	Não
	amarelas	vermelhas	pretas	creceu	creceu	creceu
<i>E. faecalis</i> E-130	Colônias	Colônias	Colônias	Não	Não	Não
	amarelas	vermelhas	pretas	creceu	creceu	creceu
<i>B. cereus</i> M1-012	Colônias	Não	Não	Colônias	Não	Não
	rosa	creceu	creceu	pretas	creceu	creceu
<i>B. cereus</i> K1B-052	Colônias	Não	Não	Colônias	Não	Não
	rosa	creceu	creceu	pretas	creceu	creceu
<i>B. cereus</i> R1-070	Colônias	Não	Não	Colônias	Não	Não
	rosa	creceu	creceu	pretas	creceu	creceu

MYP* = Agar Manitol Gema de Ovo Polimixina; KF = Agar KF Streptococcus; PAL = Agar Palcam; LPM = Agar Cloreto de lítiofeniletanol-moxalactam; BP = Agar Baird Parker; MSA = Agar Manitol

De acordo com os testes realizados e os resultados apresentados na Tabela 3 os seguintes meios foram seletivos para contagem das espécies inoculadas no Pool: KF, MYP, LPM e MSA, os quais foram utilizados para contagens de *E. faecalis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente.

5.2. Formação de biofilme monoespécies

5.2.1. Formação de biofilme de *Enterococcus faecalis* em superfície de aço inoxidável em presença de diferentes substratos

Na literatura, valores variados de contagens de *Enterococcus* em leite cru tem sido detectado, $4,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ (SOUTO, 2006) e 1×10^2 UFC.mL⁻¹ (GELSOMINO *et al.*, 2001). Assim, valores próximos foram utilizados para iniciar a formação dos biofilmes em todos os ensaios.

Neste experimento a média das 3 repetições inoculadas para o ensaio 1 (BHI) foi de $1,51 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹, para o ensaio 2 (Soro de leite) de $1,50 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ e para o ensaio 3 (leite desnatado) de $1,61 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Na tabela 4, estão apresentadas as contagens de *E. faecalis* encontradas durante à formação de biofilme em monoespécie.

A adesão bacteriana iniciou com 6 horas para todos os substratos sem diferença significativa ($p \geq 0,05$). Após 24h as contagens alcançaram valores acima de 3 logs UFC/cm² em todos os substratos, caracterizando a formação de biofilme (RONNER E WONG, 1993), (Tabela 4).

Tabela 4. Médias das contagens de *E. faecalis* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie na superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (Horas)	BHI Log ±DP	Soro de leite Log ±DP	Leite desnatado Log ±DP
6	2,22 0,73	1,77 0,64	2,47 0,54
24	5,97 0,93	4,46 0,54	5,63 0,52
48	5,96 0,55	5,13 0,26	6,05 0,24
96	6,64 0,82	6,16 1,03	6,35 1,21
168	6,45 1,33	6,14 0,84	6,38 0,19
240	<1,40 ^c 0,00	5,32 ^b 0,04	6,92 ^a 0,28

Letras a, b, c = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

O padrão de crescimento do biofilme se manteve até 168h para todos os ensaios, sem diferenças, porém o comportamento no décimo dia de contagem foi diferente para todos os substratos, sendo que em BHI, apresentou desprendimento de célula em grande quantidade, em soro de leite um leve desprendimento e em leite desnatado a formação continuou a evoluir.

Os maiores picos de crescimento foram registrados em leite desnatado com 240h com 6,92 log UFC/cm² e com 96h no BHI com 6,64 log UFC/cm², conforme observado na Figura 2.

De acordo com a figura 2 foi possível observar que em leite desnatado o *E. faecalis* continuou se multiplicando sobre a superfície de aço inoxidável e com o tempo de 240h foi registrado um aumento de 0,52 log UFC/cm². É possível encontrar na literatura trabalhos que citam a influência do leite na formação de biofilme, já que este é um alimento rico em carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais que contribuem para a permanência dos micro-organismos sobre a superfície de aço inoxidável (BOARI, 2008).

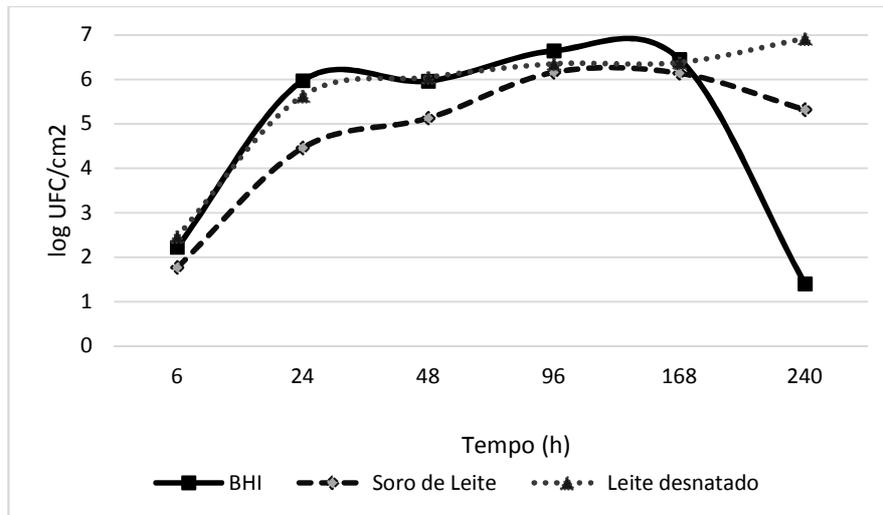


Figura 2 - Evolução do *E. faecalis* na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo.

Substratos ricos nutricionalmente, compostos por triptona, peptona e extrato de levedura promovem as maiores taxas de crescimento bacteriano em biofilme (VIANA, 2006). Isso está de acordo com os resultados experimentais, para o biofilme de *E. faecalis* em monoespécie, visto que obtivemos maiores crescimento em substratos ricos em nutrientes, como o BHI e no Leite desnatado.

Os valores obtidos neste experimento estão de acordo com os encontrados em biofilme de *E. faecalis* e *E. faecium* que em temperaturas de 25°C e 39°C após 8 dias de contato, alcançaram contagens acima de 8 log UFC/cm² em aço inoxidável (FERNANDES, 2014). Em superfície de vidro cepas de *E. faecalis* isoladas de amostras clínicas, evoluíram entre 5 a 7 log UFC/cm² (MARQUES, 2004).

O desprendimento acontece através de dois mecanismos diferentes: erosão e descamação. Quando um biofilme perde partículas pequenas ele sofre uma leve erosão. Já quando ocorre a perda de partículas grandes, ou seja, da biomassa, isso é a descamação (PICIOREANU *et al.* 2001).

O decréscimo de células de *E. faecalis* iniciou com pequenos valores a partir de 48h na presença de BHI, considerado um meio completo e rico em nutrientes para a maioria dos micro-organismos (FIGURA 3). Com 168h novos decréscimos de células de *E. faecalis* foram observados tanto para BHI quanto para soro de leite. Porém altas taxas de desprendimentos foi observado somente em BHI após 240h com 5,05 log UFC/cm² de redução. No leite desnatado não foi observado redução na contagem ao longo do tempo.

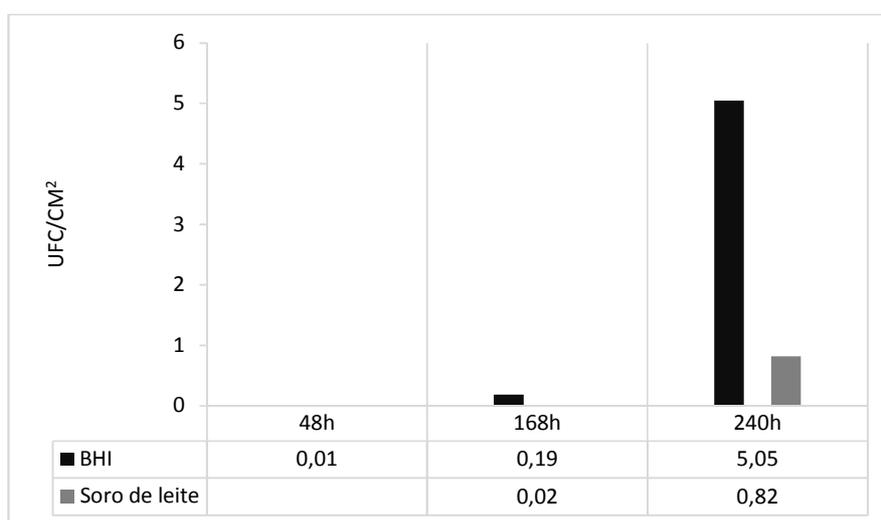


Figura 3 - Decréscimos de células do *E. faecalis* em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

Rosado (2009) encontrou valores de 1,98 ciclos de log para formação de biofilme de *E. faecium* no tempo de 6,8 dias em temperatura de 39,5°C e quando comparou os tempos de 4 e 8 dias a 25°C, observou um decréscimo médio de 0,75 log UFC/cm².

As superfícies quando são expostas as proteínas adsorvidas influenciam a ligação das células com o substrato. Ocorre um aumento da fixação quando a proteína adsorvida se liga a um ponto isoelétrico, neutralizando a densidade da

carga da superfície, aumentando assim o número de bactérias capazes de se ligar (FLETCHER,1976).

Ao longo do tempo de contagens houve a medição do pH com fita colorimétrica para todos os experimentos. A variação do pH dos *E. faecalis* na presença dos diferentes substratos estão registrados na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de pH na formação de biofilme monoespécie de *E. faecalis* medido ao longo do tempo

Tempo (h)	BHI pH	Soro de leite pH	Leite desnatado pH
0	7,5	6,5	6,5
6	7,5	5,5	6,5
24	5,0	5,5	6,0
48	6,0	5,5	6,0
96	6,0	5,5	6,0
168	6,0	5,5	6,5
240	5,5	6,0	6,0

A capacidade acidificante do *E. faecalis* já foi observado em queijo, onde a queda do pH não ultrapassou 5,5 após 24 horas (GIRAFFA, 2003). Esta faixa pode ser comprovada nos ensaios com soro de leite e BHI. Já em leite desnatado os valores reduziram até 6,0 nos dias de contagens observados. Poucas cepas possuem capacidade para reduzir pH até 5 após 24 horas de incubação a 37°C (DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001) este comportamento só foi observado com 24h no BHI em temperatura a 25°C.

O pH é um fator ambiental que interfere na adesão dos micro-organismos, levando aos desprendimentos de células, pois altera a repulsão eletrostática entre o micro-organismos e as superfícies sólidas, alterando a hidrofobicidade e a carga elétrica (CHAVES, 2004; O'TOOLE *et al.* 2000, ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). O desprendimento das células é preocupante para a indústria de alimentos, visto que é nesse momento que pode promover a

contaminação dos alimentos em altos níveis (TELGSMANN, HORN E MORGENROTH, 2004).

O pH inicial registrado na presença de BHI foi de 7,5, e no soro de leite e leite desnatado os valores foram de 6,5. Os decréscimos nos números de células obtidos entre as contagens deste experimento coincidem com alterações nos valores de pH. Na presença do BHI o pH com 168h estava 6 e ao realizar a contagem com 240h foi registrado 5,5. E no ensaio onde utilizou o soro de leite aconteceu o inverso, um aumento foi registrado. O valor de pH estava 5,5 com 168h mudou para 6 com 240h.

As diferenças nas contagens mostraram que o tempo de desprendimento pode variar de acordo com os substratos e que tais mudanças nem sempre coincidem com alterações de pH, seja para valores menores ou maiores, dando a entender que as mudanças do meio são apenas um fator que podem levar a um estresse e estimular os desprendimentos. Outros fatores como o esgotamento de nutrientes, quantidade de carbono disponível, competição por nutrientes, comunicação *quorum sensing*, entre outros motivos, podem ter influenciado os desprendimentos das células.

5.2.2. Formação de biofilme monoespécie de *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos

Listeria monocytogenes aderem fortemente em superfícies encontradas na indústria de processamento de alimentos, principalmente em aço inoxidável (HOOD, ZOTTOLA, 1997) levando à formação de biofilmes, favorecendo a sobrevivência dos mesmos em condições adversas, mesmo sobre estresse físico e químico (CHAE *et al.*, 2006).

Neste experimento o inóculo inicial nos substratos apresentaram uma média de $2,17 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ para o ensaio 1, $1,77 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ no ensaio 2 e $1,61 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ no ensaio 3. Após ser inserido o inóculo os recipientes com os

cupons foram levados a estufa a 25°C. *L. monocytogenes* à essa temperatura produz flagelo e motilidade, fator importante na adesão sobre a superfície e subsequente formação de biofilme em condições estáticas (LEMON, *et al.*, 2007).

Com 6 horas, foram registrados valores de 2,35 log UFC/cm² para BHI, indicando assim uma adesão bacteriana, porém a formação inicial do biofilme de *L. monocytogenes* apenas aconteceu a partir de 24h (TABELA 6) para todos os substratos.

Tabela 6. Médias das contagens de *L.monocytogenes* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (Horas)	BHI Log ±DP	Soro de leite Log ±DP	Leite desnatado Log ±DP
6	2,35 0,63	<1,40 0,00	1,40 0,81
24	5,39 0,69	4,36 0,65	4,20 0,11
48	5,36 ^a 0,26	3,97 ^b 0,08	<1,40 ^c 0,00
96	5,35 0,27	5,27 1,23	5,64 2,04
168	5,49 ^a 0,34	4,98 ^a 1,39	<1,40 ^b 0,00
240	<1,40 0,00	1,43 0,05	<1,40 0,00

Letras a, b, c = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

Quando comparamos com o experimento anterior o *E. faecalis* apresentou maior aderência inicial do que a *L. monocytogenes* para o leite desnatado.

Quando em condições ótimas de crescimento associado a um bom estado metabólico ocorre um aumento da sua capacidade de adesão (SMOOT, PIERSON, 1998). Isso foi observado a partir das contagens com 24h em soro de leite e leite desnatado os valores foram de 4,36 log UFC/cm² e 4,20 log UFC/cm² e não apresentaram diferenças significativas (p≥0,05) mesmo quando comparadas

com o caldo BHI, onde registramos uma contagem maior, com valor de 5,39 log UFC/cm² (TABELA 6). Estes valores estão compatíveis aos encontrados em outros experimentos, que comprovaram que o nível de adesão da *L.monocytogenes* pode variar entre 4 a 6 log UFC/cm² (GRAM *et al.*, 2007).

O padrão de comportamento da *Listeria* foi diferente ao longo do tempo quando comparado com os diferentes substratos. Houve maior equilíbrio na presença do BHI, meio rico em nutrientes para os micro-organismos, onde diferenças significativas ($p<0,05$) foram observadas apenas no tempo de 48h e com 168h (TABELA 6). Um padrão oscilatório foi observado na presença de leite desnatado (FIGURA 4).

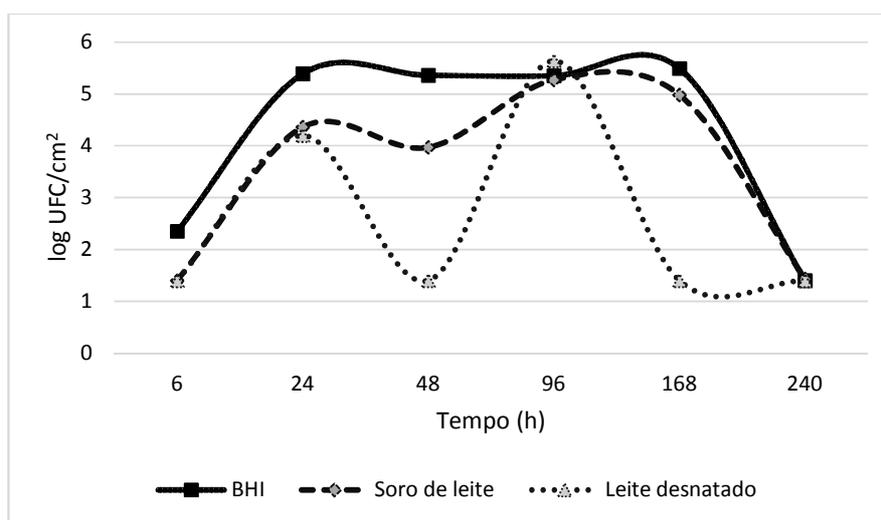


Figura 4 - Evolução do *L. monocytogenes* na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo.

A adesão deste micro-organismo na presença de compostos lácteos é controversa, alguns autores sugerem que podem ser reduzidas, conforme já apresentado por outros trabalhos, onde apresentaram redução de 1,5 log UFC/cm² na presença de proteínas. A lactose é outro componente que afeta a fixação da *L. monocytogenes* (WONG, 1998). Alguns trabalhos comprovaram

redução de *L. monocytogenes*, *Bacillus* termofilicos (PARKAR *et al.*, 2001), *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* (BARNERS *et al.*, 1999), *Pseudomonas marine* (FLITCHER 1976) e *Salmonella* Typhimurium (HELK, SOMERS, WONG, 1993) na presença de compostos lácteos ricos em proteínas.

Uma provável explicação para essas reduções seriam a presença de proteínas como a caseína e a β -lactoglobulina que em fases fluídas atuam como competidoras por sítios de ligação na superfície do inoxidável, reduzindo a capacidade das bactérias se fixarem (WONG, 1998; HELK, SOMERS, WONG, 1993).

O mecanismo de dispersão é identificado pelo processo de crescimento e desprendimento das células, pode acontecer tanto em células individuais como em microcolônias, possivelmente o biofilme utiliza esse sistema para manter o equilíbrio, como um processo programado. Quando as microcolônias são rompidas, as células planctônicas podem reiniciar a formação de biofilmes em outros espaços (STAPPER *et al.*, 2004; STOODLEY *et al.*, 2001; COSTERTON *et al.*, 1999).

O processo de dispersão foi observado na (FIGURA 4) na presença do Leite desnatado. Com 48h observamos um desvio zero e na contagem posterior com 96h a *L. monocytogenes* voltou a crescer e apresentou um aumento perceptível pelo desvio padrão de 2,04 (TABELA 6) e novamente se manteve zero a partir de 168h e continuou assim até 240h. Além disso, o substrato deste ensaio apresentou alterações estruturais visuais como grandes coágulos, provenientes das interações microbianas e abaixamento do pH. Esse efeito não foi observado no experimento anterior com biofilme de monoespécie de *E. faecalis* em nenhum dos substratos.

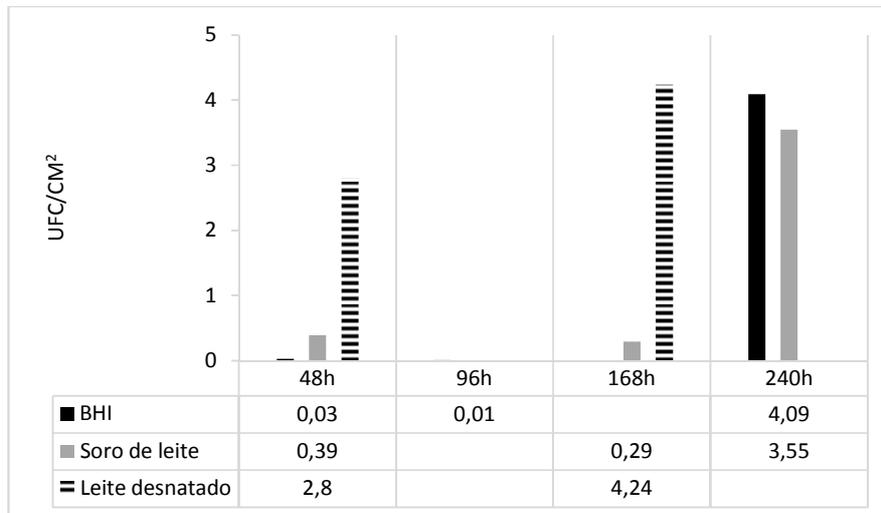


Figura 5 - Decréscimos de células do *L. monocytogenes* em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

Quanto ao decréscimo de células, pequenas oscilações ocorreram em 48h, 96h e 168h. Apenas no leite desnatado foi registrado perda da biomassa nos tempos de 48h e 168h com valores de 2,80 log UFC/cm² e 4,24 log UFC/cm², respectivamente (FIGURA 5). Na presença do soro de leite e do BHI a perda de biomassa aconteceu apenas com 240h com valores de 4,09 e 3,55 log UFC/cm².

Os valores de pH medido ao longo do tempo para biofilme de *L. monocytogenes* nos diferentes substratos estão apresentados na tabela 7. Dos 4 grandes desprendimentos registrados neste experimento observamos que três deles tiveram comportamentos compatíveis com alterações de pH, um tanto controverso, já que em alguns ensaios eles apresentam redução e em outros um aumento. O primeiro foi na presença do BHI na contagem de 240h, onde foi possível perceber que o pH medido anteriormente com 168h estava 5,5 e em 240h teve um leve aumento para 6,0. No soro de leite a alteração foi sinalizada por uma redução de pH, sendo que em 168h estava 5,5 e abaixou para 5,0 em 240h. Já no ensaio 3 o pH que se manteve 6,5 desde o início reduzindo para 5,5 com 168h.

Tabela 7 – Valores de pH no biofilme monoespécie de *L. monocytogenes* medido ao longo do tempo

Tempo (h)	BHI pH	Soro de leite pH	Leite desnatado pH
0	7,5	6,5	6,5
6	7,0	5,5	6,5
24	5,5	5,5	6,5
48	5,5	5,5	6,5
96	5,5	5,0	6,0
168	5,5	5,5	5,5
240	6,0	5,0	5,5

L. monocytogenes em biofilme monoespécie apresentou um comportamento variado de acordo com o substrato e possivelmente o pH foi um fator de estresse que estimulou os desprendimentos das células, mas não o único.

5.2.3. Formação de biofilme monoespécie de *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos

Esta bactéria é conhecida por formar biofilmes em fábricas de processamento de leite (SHARMA, ANAND, 2002), persistindo em superfícies quando em contato direto com o substrato (SCHLEGELOVA *et al.*, 2010). *Staphylococcus* ao lado dos *Enterococcus* e *B.cereus* já foram encontrados em membrana de osmose reversa, promovendo contaminação cruzada de soro de leite (ANAND *et al.*, 2014). *Staphylococcus epidermis* também já foi isolada de fazenda de vaca leiteira e laticínios e na presença de leite formaram biofilmes, principalmente quando expostos a outros compostos como glicose e NaCl (MICHU *et al.*, 2011).

O inoculo inicial do biofilme de *S. aureus* na presença de BHI, soro de leite e leite desnatado, tiveram respectivamente os valores de contagem no substrato: $1,19 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹, $1,63 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ e $1,22 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹.

Houve diferenças significativas entre os ensaios, com variações ao longo do tempo em relação a formação e redução de células nos tempos de 48h e 96h ($p < 0,05$). Com 6h o patógeno aderiu ao aço inoxidável em todos os substratos, porém apresentou maior contagem com valor de 2,51 log UFC/cm² na presença do leite desnatado (TABELA 8).

Tabela 8. Médias das contagens de *S.aureus* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (Horas)	BHI Log ±DP	Soro de leite Log ±DP	Leite desnatado Log ±DP
6	1,40 0,65	1,40 0,81	2,51 0,74
24	4,83 0,57	3,40 1,06	4,14 0,29
48	5,34 ^a 0,18	3,09 ^b 0,34	4,49 ^a 0,52
96	4,69 ^a 1,50	4,69 ^a 0,16	1,62 ^b 0,38
168	5,72 1,90	4,14 0,98	6,31 0,43
240	1,60 0,36	1,95 0,56	<1,40 0,00

Letras a, b = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com 24h iniciou a formação do biofilme em BHI com 4,83 log UFC/cm², em leite desnatado com valores de 4,14 log UFC/cm² e em soro de leite com valores de 3,40 log UFC/cm² (TABELA 8).

O auge da formação em soro de leite foi com 96h com valor de 4,69 log UFC/cm², este valor porém, é menor quando comparado com a formação de biofilme em BHI e leite desnatado que alcançaram respectivamente 5,72 logs UFC/cm² e 6,31 logs UFC/cm² após 168h.

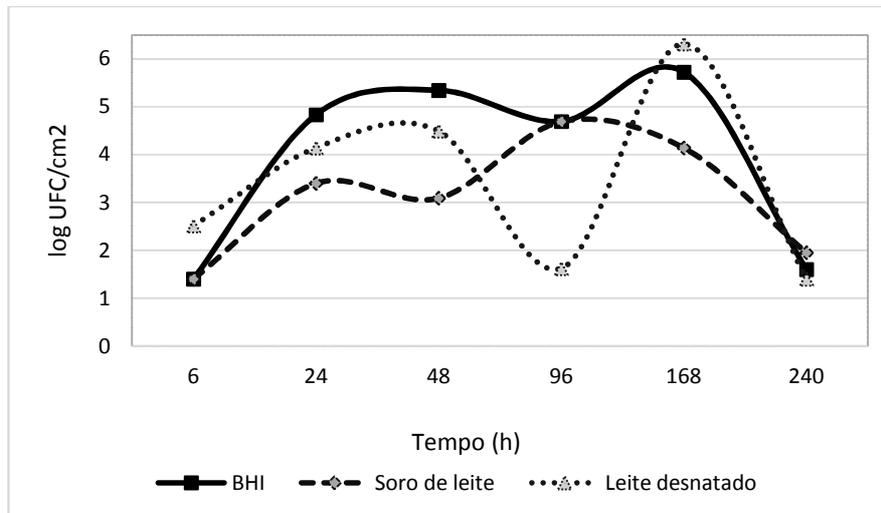


Figura 6 - Evolução do *S. aureus* na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos

Ao observar a Figura 6, percebemos que existe um comportamento diferente do *S. aureus* em relação aos substratos. Em todos os substratos houve adesão com 6h e a formação inicial do biofilme com 24h, porém apresentou diferenças significativas para os diferentes substratos no tempo de 96h e 168h ($p < 0,05$).

É possível identificar diferença entre a formação do biofilme monoespécie de *S. aureus* com os demais micro-organismos, *E. faecalis* e *L. monocytogenes* quando observamos através das curvas de crescimento nos substratos soro de leite e leite desnatado apresentadas na Figura 7.

E. faecalis apresentou um desenvolvimento maior nos dois substratos, enquanto *S. aureus* apresentou menor crescimento na presença do soro de leite e padrão semelhante de comportamento quando comparado com *L. monocytogenes* em soro de leite.

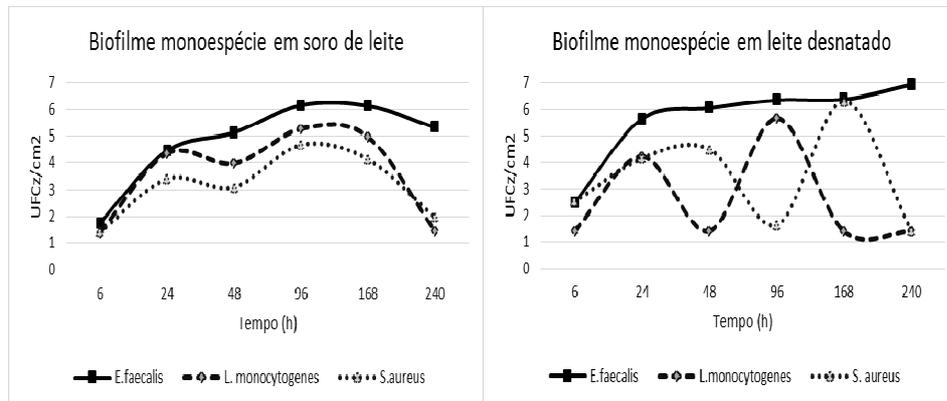


Figura 7 – Evolução do crescimento de *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em biofilme monoespécie na presença de soro de leite e leite desnatado em aço inoxidável.

O condicionado promovido pelas camadas adsorvidas é capaz de reduzir a aderência de alguns micro-organismos. Isso foi comprovado em trabalhos anteriores, onde o leite desnatado e as proteínas do leite e proteínas do soro (α -caseína, β -caseína, κ -caseína e α -lactalbumina) que inibiram a presença de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. marcescens*, *P. fragi* e *E. coli* em aço inoxidável. (BARNES *et al.*, 1999). Possivelmente isso justifica o alto número de desprendimentos observados neste experimento, principalmente na presença do leite desnatado, conforme observado na figura 8.

O primeiro grande desprendimento de células no leite desnatado aconteceu em 96 horas com redução de 2,87 log UFC/cm². Em seguida com 168h *S. aureus* voltou a formar biofilme e após 240h ocorreu um novo desprendimento das células de 4,01 log UFC/cm² (Figura 8). Esse tipo de comportamento possivelmente aponta que o substrato influencia na formação do biofilme e no tempo de desprendimento dos biofilmes.

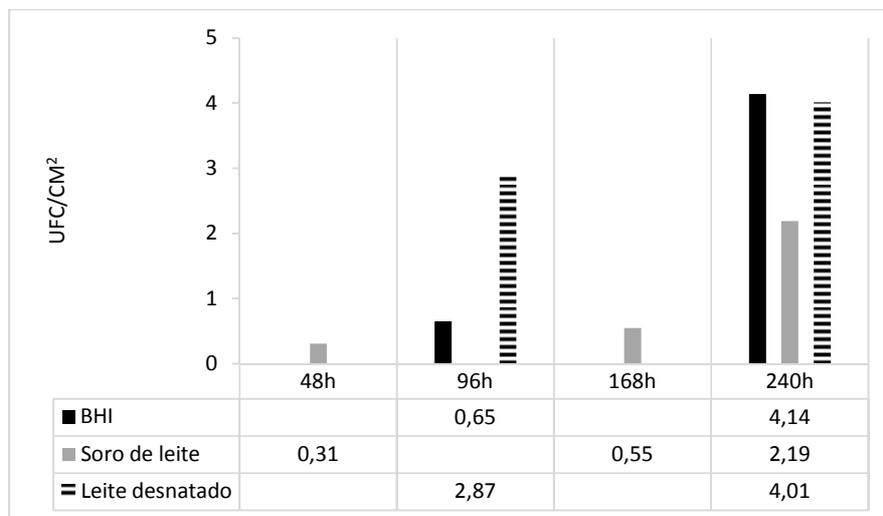


Figura 8 – Decréscimos de células do *S. aureus* em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

Na presença do soro de leite houve queda na variação das contagens a partir de 48h com um decréscimo de 0,31 log UFC/cm², em seguida com 168h com 0,55 log UFC/cm² e a diminuição de células maior aconteceu no 10º dia de contagem com valores respectivos de 4,14 e 2,19 log UFC/cm².

Quando comparamos os desprendimentos de células de *S. aureus* observados na figura 8, com os valores de pH (TABELA 9), observamos que na presença do soro de leite o pH inicial de 6,5 reduziu para 6,0 com 6h e em seguida com 48h para 5,5 e manteve-se assim até o final da contagem, mesmo com as trocas de substratos com 96h e 168h.

Na presença do leite desnatado a queda brusca de células coincidiu com a redução de pH para 4,5 acontecendo o primeiro desprendimento com 96h. Possivelmente a troca do substrato elevou o pH na contagem posterior para 5,5, mas em seguida o pH voltou a cair para 4,5 e outro desprendimento foi registrado com diferença de 4,01 ciclo log UFC/cm².

Tabela 9 – Valores de pH medido na formação de biofilme monoespécie de *S.aureus* medido ao longo do tempo.

Tempo (h)	BHI pH	Soro de leite pH	Leite desnatado pH
0	7,5	6,5	6,5
6	7,5	6,0	6,5
24	5,5	5,5	5,0
48	6,0	5,0	5,0
96	6,0	5,0	4,5
168	6,0	5,0	5,5
240	6,0	5,0	4,5

Alguns patógenos demonstraram capacidade de persistir em biofilme em contato com leite, devido à presença da lactose (WONG, 1998). Possivelmente isso justifica o comportamento observado na figura 6, onde mesmo após os desprendimentos o *S. aureus* volta a formar biofilme, evoluindo novamente.

A diferença na formação do biofilme entre os substratos, possivelmente pode ser justificado pela diferença na composição dos mesmos e coincidiu com variações do pH nos dias de contagens.

5.2.4. Formação de biofilme monoespécie de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos

Bacillus demonstram capacidade de formação de biofilme em vários substratos, porém estudos já realizados comprovaram que eles preferem interfaces de ar-líquido quando comparados com sistemas submersos (WINJMAN *et al.*, 2007).

São considerados cepas contaminantes pós-pasteurização, sendo preocupantes para os laticínios, pois costumam germinar e crescer em diferentes

equipamentos, por exemplo em superfícies de aço inoxidável dos trocadores de calor (ANAND *et al.*, 2014; BROOKS, FLINT, 2008).

O inoculo inicial de *B. cereus* deste experimento se deu com valores de $1,94 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ em BHI, de $1,06 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ na presença do soro de leite e $1,01 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ no leite desnatado.

As proteínas presentes na superfície celular influenciam o processo inicial de formação de biofilmes de *Bacillus* (PARKAR *et al.*, 2001). A adesão de *B.cereus* foi observada em 6h, inclusive quando comparado com os demais micro-organismos, este apresentou os maiores valores de adesão no tempo inicial. A formação dos biofilmes em BHI e leite desnatado aconteceu em 24h com valores respectivos de 4,15 log UFC/cm² e 5,12 log UFC/cm². Já em soro de leite o início foi em 48h com valor de 3,55 log UFC/cm². Os valores com 24h apresentam diferenças entre si (p<0,05), conforme tabela 10.

Tabela 10 - Médias das contagens de *B. cereus* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de monoespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (h)	BHI Log ±DP	Soro de leite Log ±DP	Leite desnatado Log ±DP
6	2,54 0,53	2,51 0,30	3,07 0,24
24	4,15 ^{ab} 0,52	2,96 ^b 0,26	5,12 ^a 0,64
48	4,33 ^a 0,86	3,55 ^a 0,59	<1,40 ^b 0,00
96	3,78 ^b 0,86	3,97 ^b 0,55	5,98 ^a 0,16
168	3,46 0,35	2,99 1,51	1,76 0,62
240	<1,40 0,00	<1,40 0,00	<1,40 0,00

Letras a, b = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

B. cereus apresentou o mesmo comportamento oscilatório na evolução do biofilme quando na presença do leite desnatado, quando comparado com os

biofilmes de monoespécie de *L. monocytogenes* e *S. aureus* realizados nos experimento anterior (Figura 7 e 9)

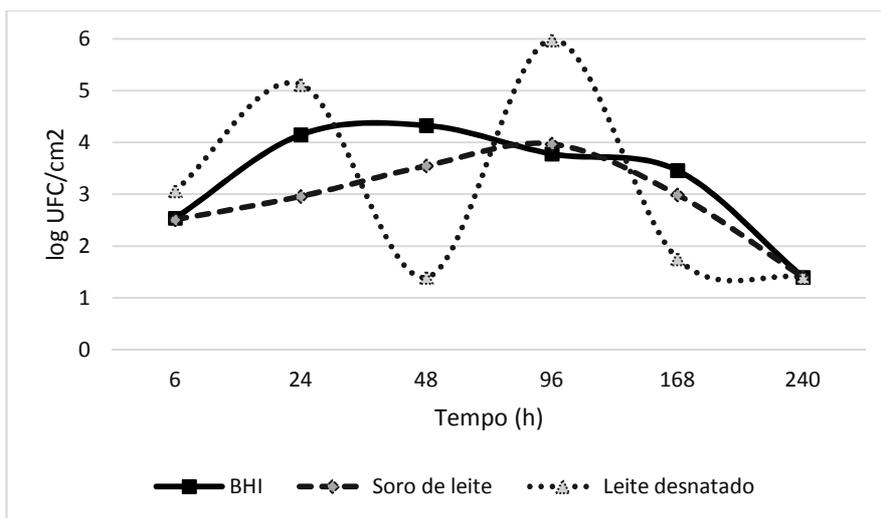


Figura 9 - Evolução do *B. cereus* na formação do biofilme monoespécie em diferentes substratos

Em BHI o *B. cereus* apresentou pequenos desprendimentos de células com 96h, 168h e a perda de biomassa com 240h com valores de 2,06 log UFC/cm². Na presença do soro de leite isso aconteceu em 168h e 240h com 0,98 e 1,59 log UFC/cm², respectivamente. No leite desnatado o comportamento foi diferente, pois a redução de células se iniciou com 2,72 log UFC/cm² em apenas 48h e depois em 168h com 4,2 log de redução e um pequeno desprendimento de células com 240h de 0,36 (FIGURA 10).

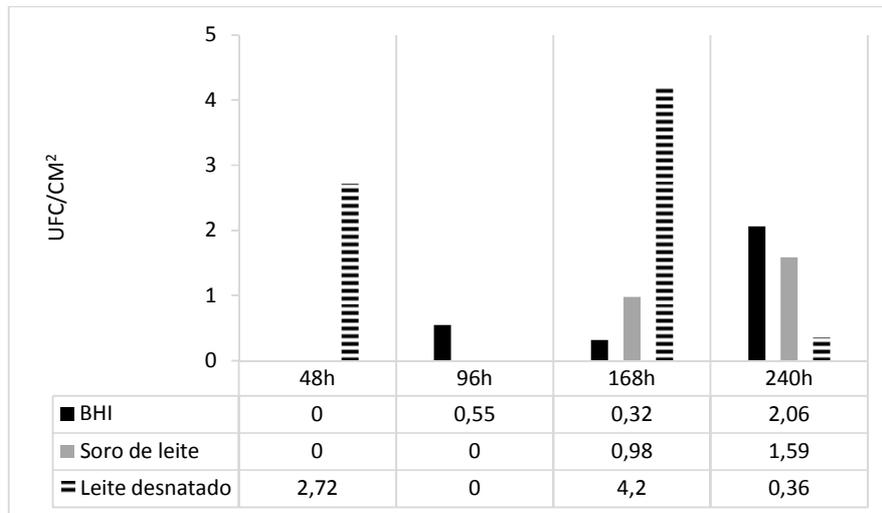


Figura 10 – Decréscimos de células do *B. cereus* em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

Apesar do pH ser um fator ambiental que afeta a formação do biofilme (O'TOOLE *et al.*, 2000), neste experimento a perda de biomassa não foi coerente com mudanças bruscas no pH quando comparados os substratos BHI e soro de leite. Já no caso do leite desnatado apenas com 168h dia o desprendimento das células de *B. cereus* coincidiu com alterações dos valores de pH, que foi medido na faixa de 6 em 96h e passou para 5,0 com 168h (TABELA 11).

Tabela 11 – Valores de pH na formação de biofilme monoespécie de *B. cereus* medido ao longo do tempo

Tempo (h)	BHI pH	Soro de leite pH	Leite desnatado pH
0	7,5	6,5	6,5
6	7,5	6,0	6,5
24	5,5	5,5	5,0
48	5,5	5,0	5,0
96	5,5	5,0	6,0
168	5,5	5,0	5,0
240	5,5	5,0	4,5

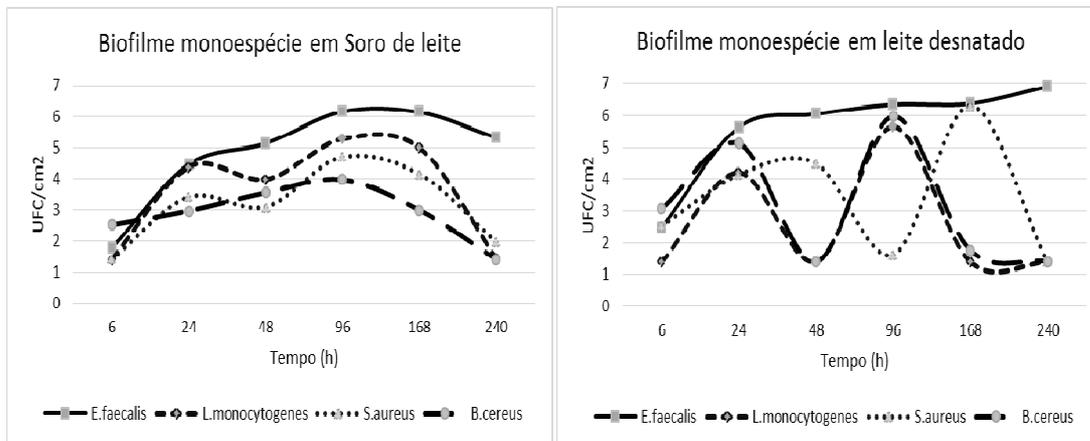


Figura 11 – Comparação do crescimento de *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e *B. cereus* em biofilme de monoespécies na presença de soro de leite e leite desnatado.

A formação de biofilme de *B. cereus* em soro de leite foi menor que os demais micro-organismos. No entanto, no leite desnatado, o padrão de comportamento foi muito semelhante ao da *L. monocytogenes* (Figura 11).

As células fisiológicas deste patógeno apresentam-se em diferentes estágios, incluindo células livres, células aderidas e esporos. De acordo com o estágio, elas podem possuir padrões diferentes de adesão e comportamento no biofilme (ANKITA, JITENDER, 2012).

A esporulação pode ocorrer dentro do biofilme e variar de acordo com as cepas e a fase de crescimento (WINJMAN *et al.*, 2007). *Bacillus* são capazes de formar biofilmes monoespécie rapidamente em aço inoxidável na presença de esporos, sugerindo assim o seu perigo potencial como agente de contaminação cruzada na indústria de alimentos (FAILLE *et al.*, 2014).

O processo de esporulação se iniciou em tempos diferentes para cada substrato (TABELA 12). De acordo com a análise de variância foi possível verificar um valor de $p \leq 0,05$, indicando diferença significativa em relação aos substratos. Na presença do BHI a primeira esporulação foi detectada em 48h, a média das contagens de 2,13 log UFC/cm², na presença do soro de leite em 168h com contagem média de 1,50 log UFC/cm² e em leite desnatado em 96h com valores de 3,18 log UFC/cm².

Tabela 12. Médias das contagens de esporos de *B. cereus* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilme monoespécie sobre superfície de aço Inoxidável em diferentes substratos.

Tempo (h)	BHI Log ±DP		Soro de leite Log ±DP		Leite desnatado Log ±DP	
48	2,13 ^a	0,50	<1,40 ^b	0,00	<1,40 ^b	0,00
96	1,74 ^b	0,30	<1,40 ^b	0,00	3,18 ^a	0,87
168	3,46 ^a	0,35	1,50 ^b	0,07	1,76 ^b	0,62
240	2,21	1,41	<1,40	0,00	<1,40	0,00

Letras a, b, = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Alguns estudos demonstraram redução da fixação de células vegetativas e de esporos de *Bacillus* termofílicos, bem como de células de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Serratia marcescens* em superfície de aço inoxidável quando na presença de leite desnatado (PARKAR *et al.*, 2001; BARNER *et al.*, 1999). Esse comportamento pode ser observado pelas contagens apresentadas na Figura 12, quando percebemos que houve pouco ou quase nenhuma esporulação no soro de leite.

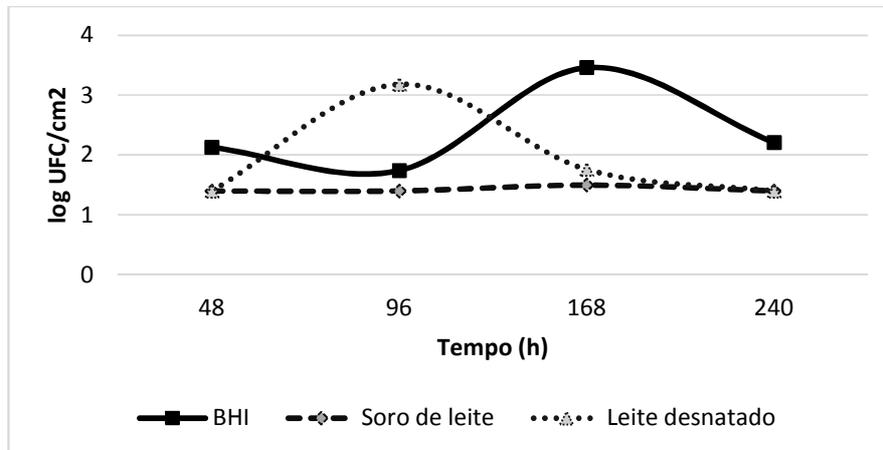


Figura 12 – Esporulação do *B. cereus* na formação do biofilme de monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo.

Valores significativos de esporos de *B. cereus* em biofilme monoespécie foram observados na presença do BHI e do leite desnatado. As reduções relevantes podem ser observadas na figura 12 de acordo com as curvas, onde em BHI houve uma leve redução entre os tempos de 48h e 96h com um decréscimo de 0,39 log UFC/cm², em seguida um novo aumento de esporos foi registrado em 168h, de 1,72 log UFC/cm². Em 240h, uma redução de 1,25 log UFC/cm² foi observada. No leite desnatado, o comportamento foi diferente, uma queda de 1,42 log UFC/cm² ocorreu entre 96h e 168h.

Esse rápido desprendimento é preocupante, visto que esporos de *B. cereus* são capazes de germinar e formar novos biofilmes (PAGEDAR, SINGH, 2012). O esporo possui maior capacidade de fixar em superfícies de contato com alimentos, quando comparado com células vegetativas, por suas características hidrofóbicas (KUMAR, ANAND 1998), favorecendo a adesão em superfícies de contatos, principalmente em aço inoxidável. (ANAND *et al.* 2014; BROOKS, FLINT, 2008; HORNSTRA *et al.* 2007).

Os esporos podem influenciar na transferência de calor e na eficiência das operações, pois ficam retidos durante o processamento do leite em trocadores de calor e no sistema de filtração, onde reduzem a permeabilidade do material (ANAND *et al.*, 2014; KUMAR, ANAND, 1998).

Além disso, os esporos são altamente resistentes ao calor, sobrevivendo aos processamentos térmicos na indústria de leites e derivados (PARKAR *et al.*, 2001) e também aos processos de limpeza (LINDSAY *et al.*, 2006), desempenhando papel importante na formação do biofilme (PARKAR *et al.*, 2001). Uma condição preocupante é que esporos de *Bacillus* termofílicos, podem permanecer em superfície de aço inoxidável, mesmo sem o condicionamento prévio da superfície (BROOKS, FLINT, 2008)

Em laticínios que processam leite em pó, a fim de se manter a quantidade aceitável de esporos termofílicos, muitas vezes desligam a planta de processamento para manutenção e limpeza por um tempo maior, impactando em uma redução da rentabilidade produtiva e no aumento dos custos operacionais (BROOKS, FLINT, 2008).

5.3. Formação de biofilme multiespécies

As interações entre as espécies microbianas influenciam na formação do EPS, favorecendo a composição de um material mais espesso e mais estável quando comparado com o produzido em monoespécie. Uma espécie produz e contribui para melhorar a estabilidade das outras espécies dentro do biofilme. (KUMAR, ANAND, 1998).

Cada espécie irá produzir um tipo diferente de polímero, mas podem fundir-se e formar regiões heterogêneas dentro da matriz homogênea do biofilme, formando propriedades semelhantes como formação de viscosidade e gel, agindo como um escudo, protegendo as células de ambientes hostis, favorecendo a

resistência dos micro-organismos a antibióticos e o desenvolvimento de infecções em humanos (ANAND *et al.*, 2014).

5.3.1. Comportamento de *Enterococcus faecalis* em biofilme multiespécie, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos

As bactérias quando em biofilme de multiespécies podem se deparar com ambientes diferentes e gerar novas populações de células que desenvolvem padrões diferentes de resistência ao estresse (STEWART E FRANKLIN, 2008).

De acordo com a avaliação estatística, o desenvolvimento de *E. faecalis* em biofilme multiespécies apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) na análise de variância e no teste de Tukey, apenas para o leite desnatado, quando comparado com o BHI e soro de leite, que apresentaram comportamentos iguais, como pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Médias das contagens de *E. faecalis* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de multiespécies em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (h)	BHI		Soro de leite		Leite desnatado	
	log ±DP		log ±DP		log ±DP	
6	2,84 ^a	0,27	1,80 ^b	0,35	2,33 ^{ab}	0,06
24	5,33	0,68	4,69	1,30	6,10	1,04
48	5,43 ^a	0,14	5,36 ^a	0,22	<1,40 ^b	0,00
96	5,70 ^b	0,43	5,63 ^b	0,67	7,32 ^a	0,66
168	6,65 ^a	0,32	6,38 ^a	0,98	1,75 ^b	0,62
240	<1,40	0,00	<1,40	0,00	<1,40	0,00

Letras a, b = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

E. faecalis presentes nos biofilmes de multiespécies apresentaram adesão inicial com 6 horas, com valores próximos e com diferenças significativas ($p < 0,05$): Após 24h alcançaram contagens de 5,33 log UFC/cm² e 4,69 logs UFC/cm² para BHI e soro de leite, já no leite desnatado foi observado contagem

maior, de 6,10 log UFC/cm² (FIGURA 13). Esse tempo marca o início de formação do biofilme e não foi identificada diferenças significativas.

Em seguida, com 48h é possível observar que o padrão deste micro-organismo em leite desnatado é diferente de acordo com a estatística, onde ele não atinge contagens significativas quando comparado com os demais substratos.

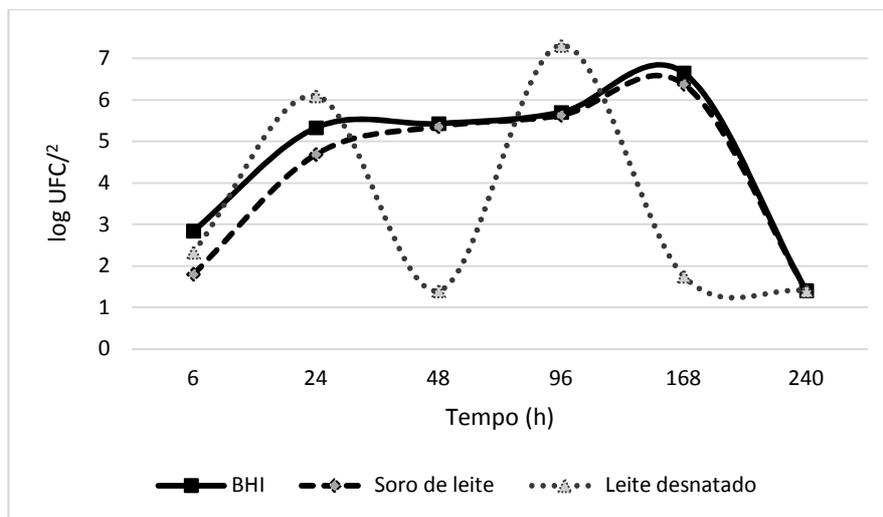


Figura 13 – Evolução do *E. faecalis* na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.

Quando em condições hidrodinâmicas semelhantes e alta taxa de crescimento é comum o biofilme apresentar instabilidade no acúmulo de células, A variabilidade é caracterizada por perda da biomassa de forma abrupta, portanto o desprendimento de célula é maior do que quando comparado com biofilme de crescimento lento (PICIOREANU *et al.* 2001). Isso está em conformidade com as evidências experimentais.

O comportamento do *E. faecalis* em relação ao tempo de formação e aos substratos soro de leite e leite desnatado pode ser observado na figura 14.

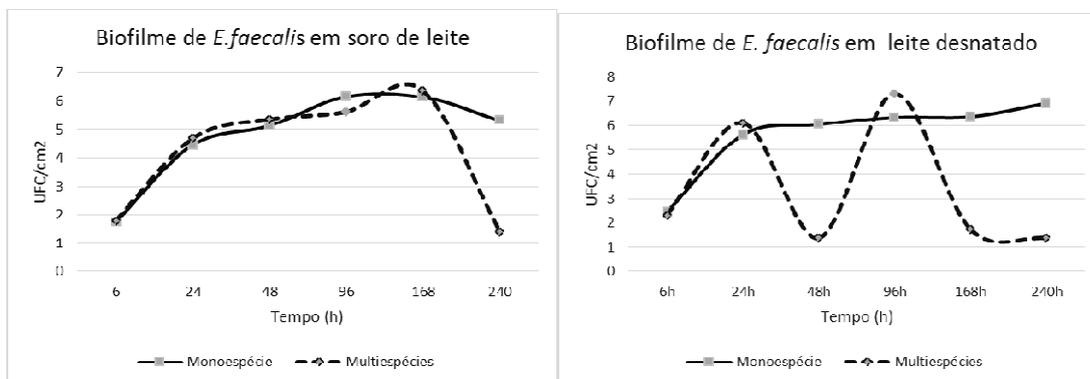


Figura 14 - Comparação do crescimento dos biofilmes de *E. faecalis* quando em monoespécie e multiespécies na presença de soro de leite e leite desnatado.

Na presença do leite desnatado aconteceram reduções com 48h e 168h em multiespécies, apresentando padrão de comportamento diferente quando comparamos o biofilme de *E. faecalis* monoespécie (FIGURA 14).

Em todos os ensaios do *E. faecalis* em multiespécies é possível observar o desprendimento das células pela diferença negativa entre os logs nos diferentes tempos, conforme dados apresentados na figura 15. Na presença do BHI e soro de leite os únicos desprendimentos de células ocorreram apenas com 240h com valores de 5,25 log UFC/cm² e no soro de leite com 4,98 log UFC/cm².

Algo diferente aconteceu no ensaio 3 onde observamos um sistema de dispersão, com perda de biomassa logo no segundo dia de formação de biofilme (48h) e depois em 168h, com valores respectivos de 4,70 log UFC/cm² e 5,57 log UFC/cm². E na sequência outra redução de células foi registrado no décimo dia de contagem com 0,35 log UFC/cm².

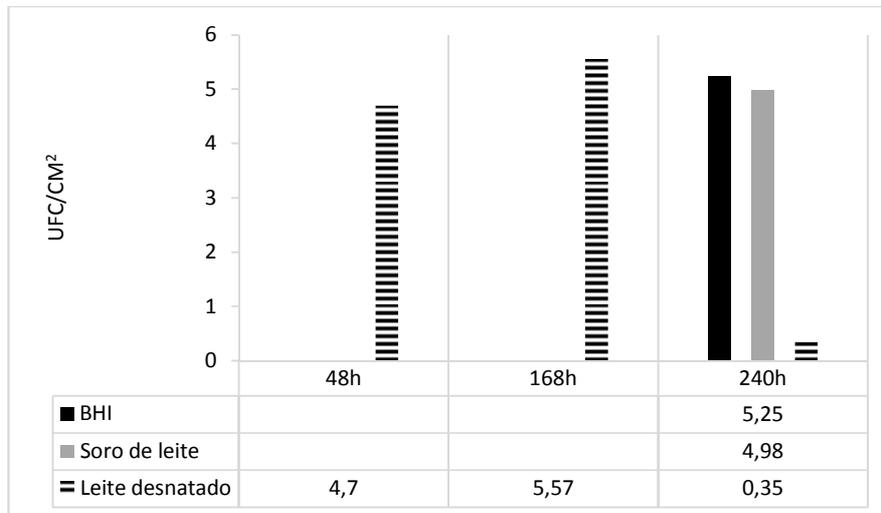


Figura 15 - Decréscimos de células do *E. faecalis* em biofilme multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

O sistema de dispersão de biofilmes é considerado um mecanismo preocupante na indústria de alimentos, por influenciar na propagação de infecções e contaminações dos sistemas industriais, porém, este processo é pouco estudado (STOODLEY *et al.*, 2001).

De acordo com os dados analisados é possível observar que para o *E. faecalis* em biofilme multiespécies a dispersão variou em relação ao tempo, substrato. Já o pH, fator ambiental não coincidiu com todos as reduções de células deste micro-organismo.

Em BHI a redução brusca que ocorreu no último dia de contagem com 240h coincidiu com a mudança de pH, cujo valor estava 6 em 168h e caiu para 5,5. Em soro de leite não houve mudança nos valores do pH que coincidiram com as quedas, visto que o meio se manteve a 5,0 desde as 48h (TABELA 14).

Em leite desnatado os valores de pH sofreu uma variação, iniciando com 6,5 e reduzindo e se mantendo a 4,5. Quando comparamos com os

desprendimentos, apenas com 168h houve alterações que coincidiram com as reduções, visto que com 96h estava 5,5 e com 168 caiu novamente para 4,5.

Tabela 14 – Valores de pH na formação de biofilme multiespécies medido ao longo do tempo

Tempo (h)	BHI pH	Soro de leite pH	Leite desnatado pH
0	7,5	6,5	6,5
6	7,5	6,0	6,5
24	5,5	6,0	4,5
48	6,0	5,0	4,5
96	6,0	5,0	5,5
168	6,0	5,0	4,5
240	5,5	5,0	4,5

A atividade interna do biofilme pode ser limitada por vários mecanismos como a quantidade de carbono disponível, ou seja, nutrientes (BLASCHEK, WANG, AGLE, 2007), a competição por estes nutrientes (GNANOU *et al.*, 2008; GIULLIER *et al.*, 2008), a produção de antimicrobianos, como bacteriocinas, ácidos e peróxido de hidrogênio (LIU *et al.*, 2008; GALVEZ *et al.*, 2007; COTTER *et al.*, 2005), fatores fisiológicos, condições ambientais e a variação genotípica que pode acontecer através da mutação e seleção (STEWART, FRANKLIN, 2008).

A formação de biofilme de *Enterococcus* é preocupante para a indústria de alimentos, visto que os mesmos podem ser limitados através de tecnologias de processamento, porém não eliminado totalmente (GIRAFFA, 2002). A pasteurização, por exemplo, pode não eliminar tais micro-organismos (JAVED , MASUD , AIN, 2011).

5.3.2. Comportamento da *Listeria monocytogenes* em biofilme multiespécies, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos

A *Listeria* sobrevive bem em biofilmes multiespécies e a sua formação ocorre em diferentes superfícies, como aço inoxidável, policarbonato, plástico, borracha ou madeira (CHMIELEWSKI, FRANK, 2003; LERICHE, CARPENTIER, 2000). Apesar disso, este micro-organismo apresentou baixo crescimento em quase todos os substratos, quando na presença de outros micro-organismos, conforme apresentado Tabela 15.

Tabela 15 Médias das contagens de *L. monocytogenes* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de multiespécies em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (h)	BHI		Soro de leite		Leite desnatado	
	log ±DP		log ±DP		log ±DP	
6	1,40	0,65	2,51	0,65	1,40	0,38
24	<1,40	0,00	2,14	0,86	2,55	2,00
48	2,20	1,39	1,77	0,65	1,93	0,93
96	2,63 ^{ab}	1,22	1,71 ^b	0,54	4,16 ^a	0,72
168	4,12 ^a	0,53	2,15 ^{ab}	1,31	1,76 ^b	0,62
240	<1,40	0,00	<1,40	0,00	<1,40	0,00

Letras a, b = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A adesão inicial aconteceu em todos os substratos com 6 horas, sem diferenças significativas ($p \geq 0,05$), porém a evolução do biofilme foi lenta para todos os substratos. Apenas com 96h na presença do leite desnatado e com 168h em BHI, este patógeno teve um aumento significativo, indicando o início de formação do biofilme quando comparado com o soro de leite e com os demais tempos, mas logo aconteceram perdas e não voltaram mais a formar biofilme (TABELA 15).

Este patógeno é preocupante para indústria de alimentos, pois quando aderida à superfície elas passam a adquirir novas propriedades como uma maior sensibilidade aos desinfetantes (LERICHE, CARPENTIER, 2000; KUMAR, ANAND 1998). A *L. monocytogenes* apresenta resistência a condições ambientais adversas, como baixo pH (ROCOURT; BUCHRIESER; 2007).

Estudos com *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* reportam que a formação do biofilme sofre alteração de acordo com a variação de temperatura e pH (NGUYEN NGUYEN *et al.*, 2014). *Pseudomonas fragi* demonstrou adesão máxima em aço inoxidável em pH em torno de 7-8 (STANLEY 1983). Já *Listeria monocytogenes*, *Serratia Liquefaciens*, *Shigella boydii*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus enteritidis* e *Bacillus cereus*, foram induzidos em condições ácidas (NGUYEN, YANG; YUK., 2014).

As diferenças no comportamento da *L.monocytogenes* frente aos diferentes substratos em biofilme multiespécies estão na figura 16.

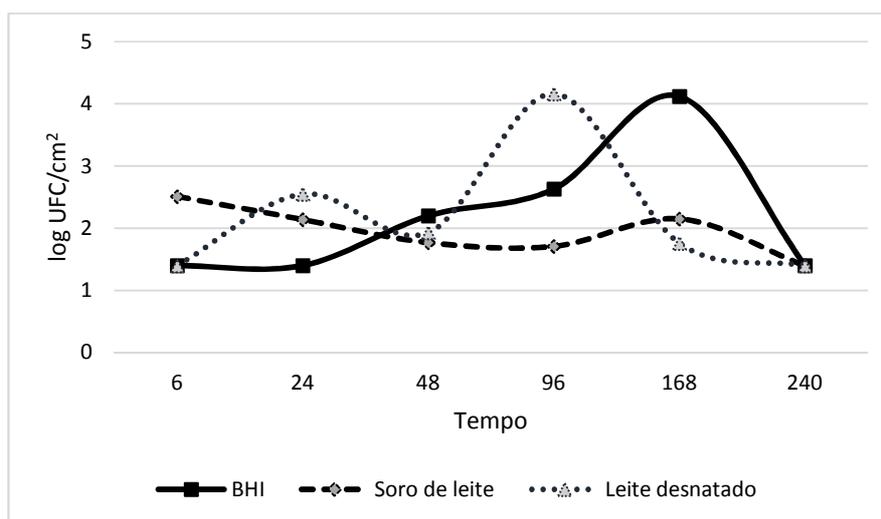


Figura 16 - Evolução do *L.monocytogenes* na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.

Houve quase nenhuma formação de biofilme e as que ocorreram, foram acompanhadas na sequência de desprendimentos, como percebemos na figura 16 e no gráfico apresentado na figura 17.

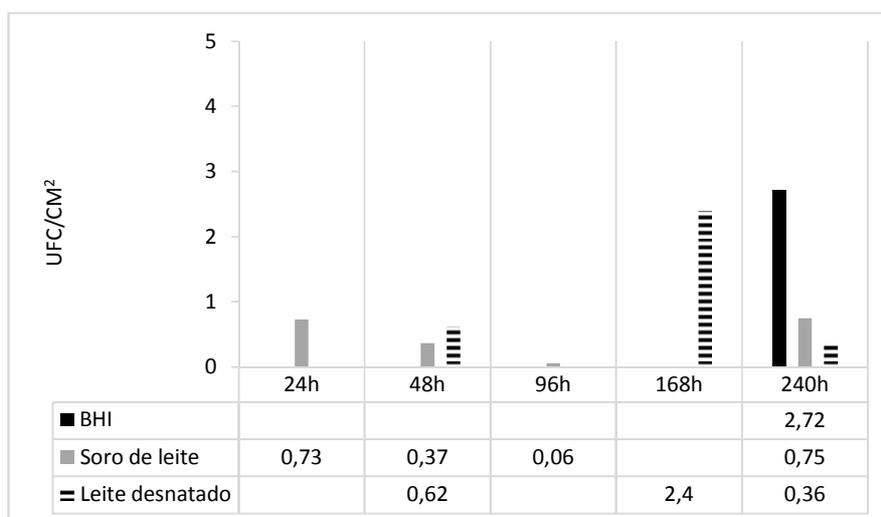


Figura 17 - Decréscimos de células do *L. monocytogenes* em biofilme multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

De acordo com as evidências experimentais, a adesão da *L. monocytogenes* pode ser influenciada pelos substratos (TABELA 15). Porém, na literatura encontramos outros fatores que também apresentam interferência na adesão e crescimento deste patógeno, como as características das superfícies, a influência da hidrofobicidade, das cargas elétricas, flagelos e as interações entre os micro-organismos e com outras células (DI BONAVENTURA *et al.*, 2008; ABACHIN *et al.*, 2002; VATANYOOPAISARN *et al.*, 2000; BRIANDET *et al.*, 1999; COSSART, LECUIT 1998; MAFU *et al.*, 1991). Além disso, pesquisas demonstram que este micro-organismo quando exposto a alta temperatura produzem proteínas em resposta ao estresse promovido pelo calor (CHMIELEWSKI, FRANK, 2003;

DAVEY, O'TOOLE, 2000), que por sua vez influenciam no desenvolvimento do biofilme.

O poder de adesão da *L.monocytogenes*, na presença de outros micro-organismos pode ser aumentado ou reduzido (CARPENTIER, CHASSAING 2004). Estudos anteriores demonstraram que células residuais de *L. monocytogenes* desenvolvidas em biofilme misto com *Lactobacillus lactis*, apresentou fraca multiplicação, levantando a hipótese de que possivelmente alguns EPS podem atuar como interferente, além das modificações fisiológicas sofridas por este patógenos no processo de interação (HABIMANA *et al.*, 2009).

5.3.3. Comportamento do *Staphylococcus aureus* em biofilme multiespécies, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos

Regularmente este patógeno é isolado de plantas de processamentos em diferentes superfícies, incluindo em aço inoxidável, onde aderem e formam biofilmes (ARCHER *et al.*, 2011; PASTORIZA *et al.*, 2002;).

Em todos os ensaios este patógeno iniciou o processo de adesão com 6h e a evolução foi lenta. Com 24 horas no BHI e no soro de leite as médias das contagens foram de 1,53 log UFC/cm² e 1,86 log UFC/cm² entre os valores observados. Estes valores diferem do leite desnatado (p<0,05), onde houve formação de biofilme e a contagem atingiu 4,80 log UFC/cm², conforme apresentados na tabela 16.

Tabela 16 Médias das contagens de *S.aureus* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de multiespécie em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (h)	BHI Log ±DP	Soro de leite Log ±DP	Leite desnatado Log ±DP
6	1,40 0,64	1,40 0,64	1,40 0,64
24	1,53 ^b 0,23	1,86 ^b 0,81	4,80 ^a 1,27
48	<1,40 0,00	<1,40 0,00	1,58 0,31
96	2,40 1,28	3,08 1,58	3,67 0,19
168	2,54 1,16	<1,40 0,00	1,76 0,62
240	<1,40 0,00	<1,40 0,00	1,61 0,37

Letras a, b = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

Após 48h houve redução das contagens para todos os substratos. Um aumento em 96h foi registrado com contagem de 2,40 log UFC/cm² no BHI, 3,08 log UFC/cm² para o soro de leite e 3,67 para o leite desnatado. Já no décimo dia de contagem apenas o leite apresentou diferença em relação aos outros dois ensaios. Esse comportamento pode ser observado também na Figura 18.

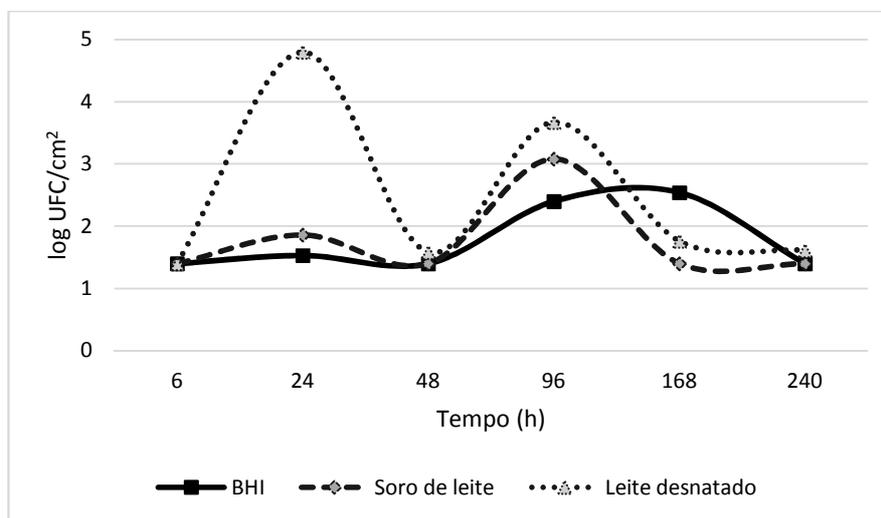


Figura 18 - Evolução do *S. aureus* na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.

Em relação ao desprendimento, todos os ensaios tiveram o primeiro com 48 horas, porém o ensaio 1 e 2 apresentou o equivalente às perdas respectivas de 0,13 log UFC/cm² e 0,46 log UFC/cm². Já quando comparado com o ensaio 3, houve diferença em relação a quantidade de decréscimo que foi de 3,22 log UFC/cm². As curvas apresentadas na Figura 18 demonstram este comportamento.

O segundo desprendimento também apresentou diferença entre os diferentes substratos, acontecendo com 168h (7º dia) apenas para os ensaios 2 e 3, com valores respectivos de 1,68 log UFC/cm² e 1,91 log UFC/cm². Esse comportamento pode ser observado na figura 19.

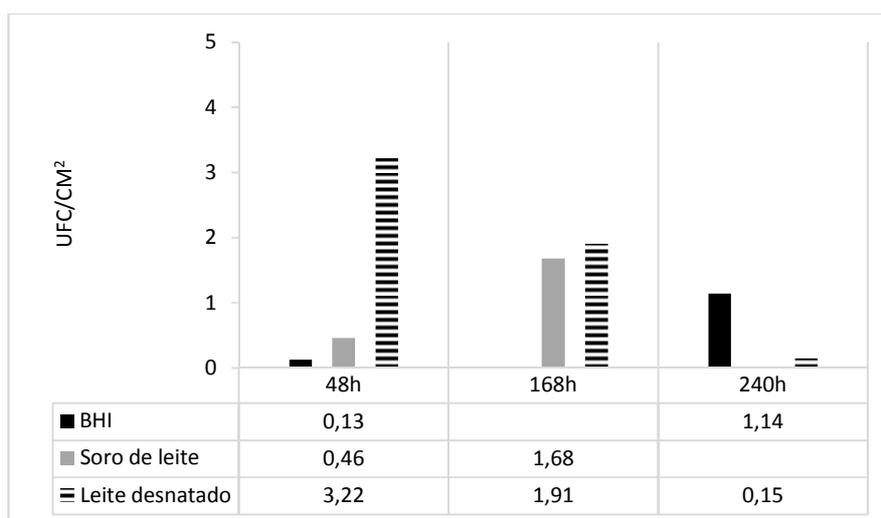


Figura 19 - Decréscimo de células do *S. aureus* em biofilme monoespécie em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

Ao alcançar o décimo dia o ensaio 3 novamente apresentou um decréscimo de 0,15 log UFC/cm², diferente do ensaio 2 e 1 que também apresentou desprendimentos em torno de 1,14 log UFC/cm².

S. aureus pode ter sido inibido por ser um micro-organismo que não responde bem a competição por nutrientes ou ainda pelo acúmulo de metabólitos

tóxicos, produzidos durante as interações e que podem ser fator limitante (IST, 2008).

5.3.4. Comportamento do *Bacillus cereus* em biofilme multiespécie, em superfície de aço inoxidável na presença de diferentes substratos

Vários isolados de *Bacillus* spp. foram reportados em diferentes indústrias, incluindo de alimentos e bebidas, onde 25% dos isolados das linhas de processamentos lácteos são compostos por *Bacillus cereus*, frequentemente encontrado em associação com outras espécies, contribuindo para a formação de biofilmes mistos, principalmente quando na presença de outras espécies esporuladas (FAILLE *et al.*, 2014). Os esporos desde micro-organismos apresentam maior resistência aos protocolos de limpeza (LINDSAY *et al.*, 2006) quando comparado com células vegetativas.

Este patógeno, além de ser responsável por DTAs e promover aumento da resistência dos processos de higienização, podem produzir enzimas extracelulares, contribuindo para deterioração dos alimentos (FAILLE *et al.*, 2014).

O leite contém mais de 400 ácidos graxos diferentes, onde 70% da gordura do leite é saturada e 11% são ácidos gordos de cadeia curta, com predominância do ácido butírico (MANSSON, 2008). A escolha do leite desnatado se deve ao fato de que queríamos evitar os efeitos da gordura sobre a adesão bacteriana, uma vez que outros trabalhos já relataram que esses componentes interferem na interação com a superfície hidrófila do aço inoxidável (BARNES *et al.*, 1999) e também que o ácido butírico presente no leite derivado da lipólise da gordura do leite, promovem a formação de biofilme, principalmente do gênero *Bacillus*, visto que ele induz a expressão dos genes *tasA*, responsável pela produção da matriz de biofilme (PASVOLSKY *et al.*, 2014).

Houve adesão inicial com 6h para os substratos. Em seguida é possível observar que com 24h houve diferenças significativas ($p < 0,05$), onde a formação

do biofilme aconteceu apenas na presença do BHI e Leite desnatado, com valores acima de 3 log UFC/cm² (TABELA 17).

Tabela 17. Médias das contagens de *B. cereus* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilmes de multiespécies em superfície de aço inoxidável em diferentes substratos

Tempo (h)	BHI		Soro de leite		Leite de desnatado	
	log ±DP		log ±DP		log ±DP	
6	1,88	0,82	1,40	0,70	2,92	0,13
24	4,09 ^b	0,24	2,50 ^c	0,50	6,20 ^a	0,60
48	3,39	1,75	1,69	0,36	1,40	0,86
96	3,66 ^a	0,99	2,68 ^{ab}	1,25	<1,40 ^b	0,00
168	3,44 ^a	0,67	1,58 ^b	0,31	1,76 ^b	0,62
240	<1,40	0,00	<1,40	0,00	<1,40	0,00

Letras a, b, c = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

Em soro de leite não houve formação de biofilme em nenhum tempo de contagem, apenas baixa adesão em tempos variados, conforme imagem na figura 20.

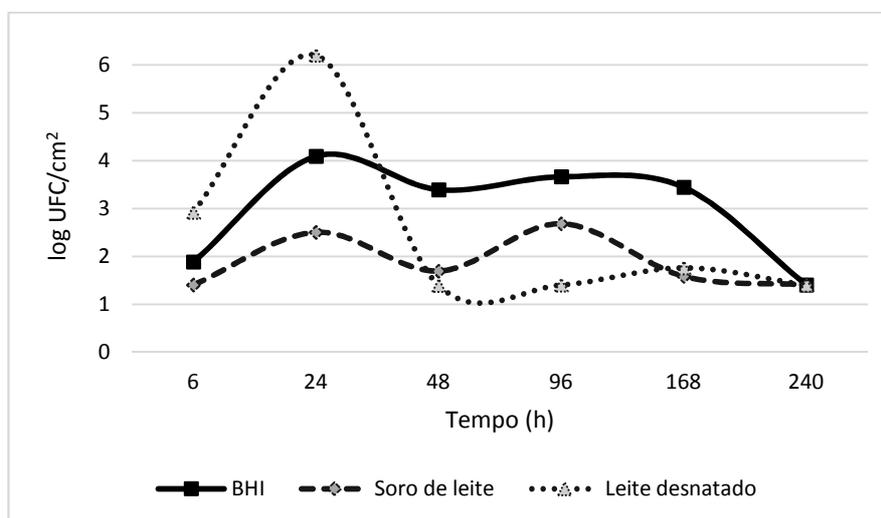


Figura 20 - Evolução do *B. cereus* na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.

Ao analisar o ensaio 3, na presença do leite desnatado o desprendimento aconteceu apenas duas vezes, o primeiro foi com o tempo inicial de 48 horas, com valor de 4,81 log UFC/cm² indicando uma perda de grandes quantidades de células. E em 240 horas com perda de poucas células de 0,36 log UFC/cm² (FIGURA 21).

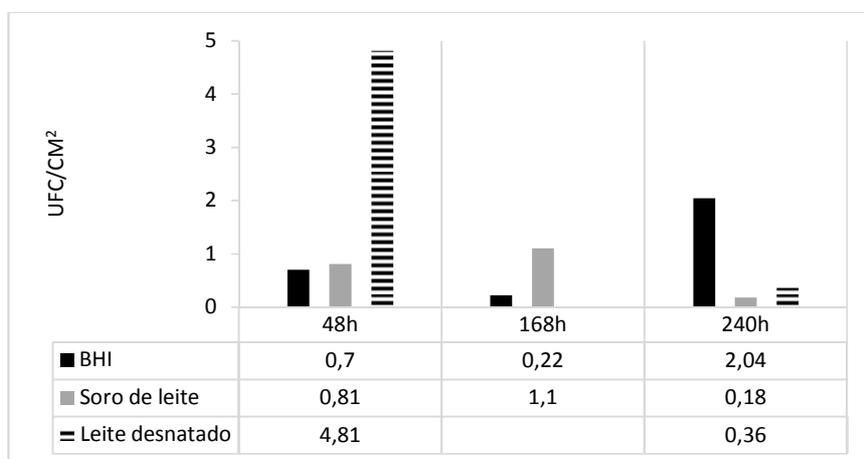


Figura 21 - Decréscimo de células do *B. cereus* em biofilme multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo (log UFC/cm²).

Neste experimento esporos de *B. cereus* não alcançaram contagens na presença de soro de leite. Provavelmente a condição do meio não sofreu mudança brusca, quando comparado com o BHI e leite desnatado, onde a esporulação se iniciou com 48 horas, apresentando 2,91 log UFC/cm² e com 96h com 2,18 log UFC/cm², neste tempo inclusive é possível perceber diferenças significativas ($p < 0,05$), (TABELA 18).

Tabela 18. Médias das contagens de esporos de *B. cereus* (log UFC/cm²±desvio padrão) em biofilme multiespécies sobre superfície de aço Inoxidável em diferentes substratos.

Tempo (h)	BHI		Soro de leite		Leite desnatado	
	log ±DP		log ±DP		log ±DP	
48	2,91	1,43	<1,40	0,00	<1,40	0,00
96	3,32 ^a	0,66	<1,40 ^b	0,00	2,18 ^{ab}	0,50
168	3,48 ^a	0,60	<1,40 ^b	0,00	1,76 ^b	0,62
240	<1,40	0,00	<1,40	0,00	<1,40	0,00

Letras a, b = Médias na mesma linha acompanhadas com letras minúsculas diferentes indicam que as contagens são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

A evolução da esporulação em biofilme multiespécies pode ser observada na figura 22.

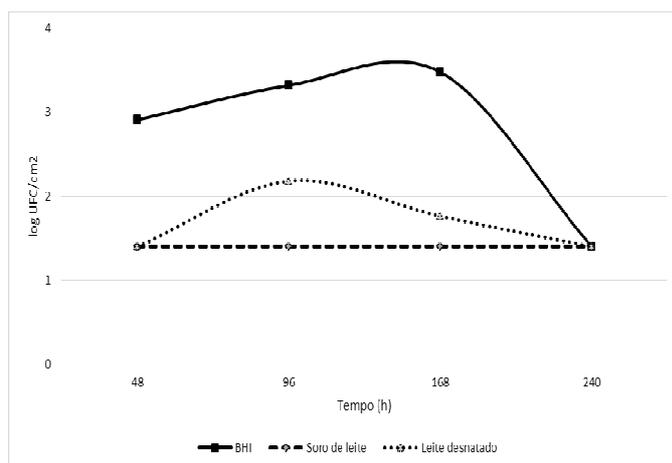


Figura 22 – Esporulação do *B. cereus* na formação do biofilme de multiespécies em diferentes substratos ao longo do tempo.

A presença de biofilmes na indústria de alimentos resulta em redução do prazo de validade do produto (ZOTOLLA 1994) e causa impacto direto sobre a segurança dos alimentos (SIMÕES, VIEIRA 2009). A falta de informação em relação ao desenvolvimento e controle de biofilmes em fábricas de laticínios levam as indústrias aumentarem o fluxo de limpeza para reduzir a formação de biofilme

(FLINT, BREMER, BROOKS, 1997), aumentando assim custos e reduzindo a produção.

O comportamento dos micro-organismos ao longo do tempo nos diferentes tratamentos aplicados quando comparados os dois modos de desenvolvimento de biofilme (monoespécie e multiespécies) na figura 23.

E. faecalis foi o micro-organismo que apresentou maior crescimento em todos os substratos (FIGURA 23) e um comportamento muito parecido entre os ensaios, demonstrando maior crescimento em soro de leite e leite desnatado quando em monoespécie. O comportamento deste patógeno se destacou dos demais apenas em leite desnatado quando em multiespécies. *L. monocytogenes* cresceu bem em monoespécie e foi reduzida quando em multiespécies, assim como *S. aureus* e *B.cereus*.

A exclusão competitiva é uma estratégia usada para inativar biofilmes de patógenos em ambientes de processamento alimentar (KIM *et al.*, 2013), porém poucas informações sobre o comportamento dos micro-organismos quando em multiespécies é conhecida, visto que é difícil realizar pesquisas quando utilizamos vários micro-organismos em conjunto.

Existem estudos que levantam a hipótese de que a maioria dos surtos causados por agentes etiológicos transmitidos por alimentos, pode estar associados a biofilmes, por isso eles são esporádicos e não contínuos (ZOTTOLA, 2001).

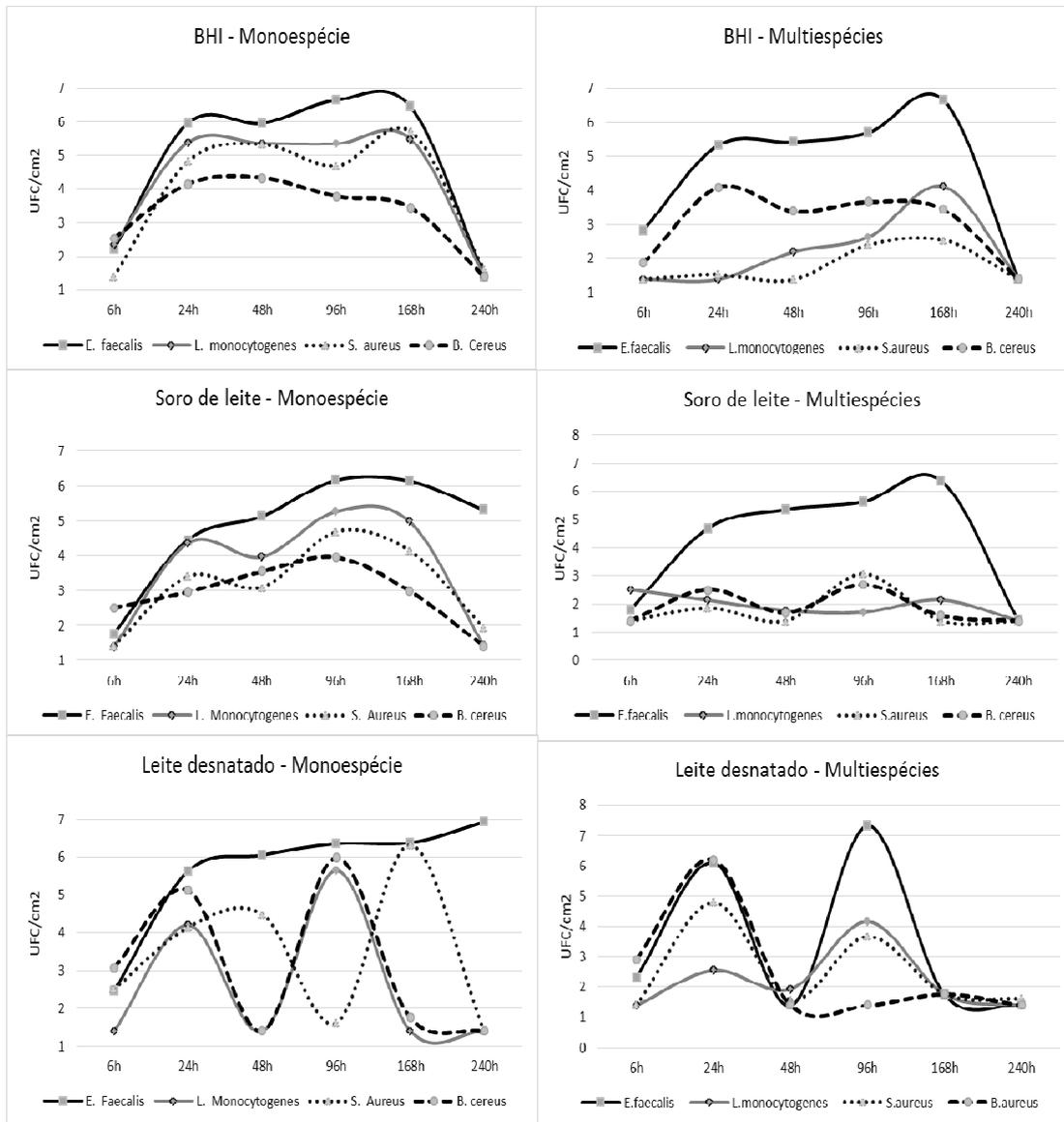


Figura 23 – Comportamento dos micro-organismos (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis* e *S. aureus*) em diferentes substratos (BHI, soro de leite e leite desnatado) ao longo dos tempos de contagens.

É necessário aprofundar as observações em relação ao comportamento dos micro-organismos quando em conjunto, para conhecer como e de que maneira as reduções de algumas cepas, na presença dos diferentes substratos acontecem. A formação dos compostos resultado das interações microbianas, a

produção do EPS e a influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos podem colaborar para que no futuro tais mapeamentos somem as aplicações práticas, oferecendo soluções efetivas e econômicas para o setor industrial em especial a de alimentos.

6 CONCLUSÃO

- ✓ *E. faecalis* apresentou maior equilíbrio em seu comportamento em biofilme de monoespécie na presença de todos os substratos quando comparado com os demais micro-organismos.
- ✓ *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus* apresentou sistema de dispersão em biofilme de monoespécie na presença do leite desnatado.
- ✓ *E. faecalis* foi o micro-organismo dominante em multiespécies, porém apresentou o processo de dispersão na presença do leite desnatado.
- ✓ *L. monocytogenes* e *B. cereus* em multiespécies não formou biofilme em soro de leite e apresentou dificuldade de crescimento nos outros dois substratos. *S. aureus* teve baixo crescimento e não formou biofilme em BHI.
- ✓ A esporulação de *B. cereus* não ocorreu na presença do soro de leite.
- ✓ A formação dos biofilmes de todos os patógenos analisados foi maior na presença do leite desnatado, quando comparado com os demais substratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABACHIN, E., C. POYART, E. PELLEGRINI, E. MILOHANIC, F. FIEDLER, P. BERCHE, AND P. TRIEU-CUOT. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.43, p.1-14, 2002.

ADESIYUN, A.A., L.A. WEBB, AND H.T. ROMAIN. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, v. 6, p. 629–632, 1998.

ALMEIDA R.A, OLIVER S.P. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, London, v.31, p.205-212, 2001.

ANAND S, SINGH D. Resistance of the constitutive microflora of biofilms formed on whey reverse-osmosis membranes to individual cleaning steps of a typical clean-in-place protocol. **Journal Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6213–22, 2013.

ANAND S., SINGH D., AVADHANULA M., MARKA S. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p.18-33 2014.

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

ANDRADE, N.J.; AJAO, D.B; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n.11, p. 1454-1458, 1998.

ANKITA P., JITENDER S. Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. **International Dairy Journal**, v. 23, n.1, p. 30-35, 2012.

ANR. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos – VE-DTA**. Disponível em:
http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf. Acesso em: 22/07/2014.

APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed. APHA, Washington, D.C., 2001.

ARCHER, N.K., MAZAITIS, M.J., COSTERTON, J.W., LEID, J.G., POWERS, M.E., SHIRTLIFF, M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, p. 445–459, 2011.

- ASAO, T., Y. KUMEDA, T. KAWAI. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology Infectology**, v. 130, p. 33–40, 2003.
- BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 25, p. 12-19, 1962.
- BALABAN, N. and RASOOLY, A. *Staphylococcal* enterotoxins. **Internatonal Journal Food Microbiology**, v. 61, p. 1–10, 2000.
- BARANCELLI, G.V. **Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, Pirassununga, 115f., 2010.
- BARNES L.M., LO M.F., ADAMS M.R., CHAMBERLAIN A.H.L. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.10, p. 4543-4548, 1999.
- BC CDC British Columbia Centre for Disease Control – **Foodborne illness outbreaks** Disponível em :< http://www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/34B36D22-D767-4140-B032-35FE8AAD409F/0/Outbreak_Bacillus_Milk.pdf>. Acesso em: 09/06/2015.
- BEHMER, A.M.L. **Tecnologia do leite**: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 15.ed. São Paulo, 319p., 1991.
- BLAIOTTA, G.; ERCOLINI D., PENNACCHIA C., FUSCO V., ASABURI A.C., PEPE O. VILLANI F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *seL* in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v.97, n.5, p.719-730, 2004.
- BLASCHEK H.P., WANG H.H., AGLE M.E. **Biofilms in the food environment**. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, p.194 2007.
- BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 94p., 2008.
- BORGES, M.F.; ANDRADE, A. P. C.; ARCURI, E. F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.K. ***Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos**. Documentos 119, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, junho, 31p. 2009.
- BOURION, F. AND CERF, O. , Disinfection efficacy against pure respect larger energy densities would be required to eliminate culture and mixed population biofilms of *Listeria innocua* and break up clusters of cells. Further experiments are *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon® and rubber. **Sciences des aliments**, v.16, p.151–166, 1996.
- BRASIL **Resolução RDC no 12** (de 02 de janeiro de 2001). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001b. Disponível em: <

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 15 junho 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano mais pecuária. 2014. Disponível** em: <
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/Publicacao_v2.pdf>. Acesso em: 13/06/2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. **Valor bruto da produção.** Janeiro de 2015 Disponível em: <
<http://www.agricultura.gov.br/ministerio/gestao-estrategica/valor-bruto-da-producao>>. Acesso em: 13/06/2015.

BRASIL (a) – SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE - SUS. **SVS - Doenças transmitidas por alimentos,** disponível em:< <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta>>. Acesso em: 22/0/2015.

BHEMER, P.J.; MONK, I.; OSBORNE, C.M. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surface in the presence or absence of *Flavobacterium* sp. **Journal of Food Protection**, Ames, v.64, n.9, p.1369-1376, 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, p.254–62, 2006.

BRIANDET, R., V. LERICHE, B. CARPENTIER, AND M. N. BELLON-FONTAINE. Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 994-998, 1999.

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

CARIOLATO D.; ANDRIGHETTO C.; LOMBARDI A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v. 19, p. 886-892, 2008.

CARFORA V., CAPRIOLI A., SAGRAFOLI D., BOSELLI C., GIACINTI G., GIANGOLINI G., SORBARA L., DOTTARELLI S., BATTISTI A., AMATISTE S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy producing Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12- 15, 2015.

CARPENTIER B.; CHASSAING D.; Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 111-122, 2004.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, n. 3, p. 262-267, 2007

CDC **Multistate outbreak of listeriosis linked to imported frescolina marte brand ricotta salata cheese (Final Update)**. 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>>. Acesso em 07/07/2015.

CDC. **1993 Foodborne disease outbreak line listing**, 1993. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/1993_linelist.pdf> Acesso em: 10/05/2014

CDC, **1997 Foodborne disease outbreak line listing**. Disponível em: http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/1997_linelist.pdf> acesso em 10/05/2014.

CDC 2013 (a) **CDC and food safety**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>>04/019/036/2013, acesso em 10/02/2014.

CDC 2013 (b) **VS Recipe for food safety infographic**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/Listeria/infographic.html#risk>. Page last reviewed June 4, 2013. Acesso em 06/07/2015.

CDC 2013 (c) - **Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1998-2008**. MMWR. V.62, n.2, p.1-34, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6202a1.htm>>. Acesso em: 09/06/2015.2008.

CDC, 2013 (d) – **Surveillance for foodborne disease outbreaks — United States, 2009–2010**. Acesso em 15/05/2014. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6203a1.htm?s_cid=mm6203a1

CDC 2014 (a) - **Foodborne illness, foodborne disease**, (sometimes called “Food Poisoning”). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html>>. Page last reviewed September 23, 2014. Acesso em:10/11/2014.

CDC 2014 (b) - **No pasteurized disease outbreaks**, 1993-2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodsafety/rawmilk/nonpasteurized-outbreaks.html#nonpasteurized> última revisão 12/12/2014.Acesso em 08/06/2015.

CDC 2014 (c). **Listeria statistic**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>. Acesso em:22/07/2015.

CDC 2015 (a). **Foodborne outbreak online database (FOOD)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>> Acesso em: 10/06/2015.

CDC, 2015 (b). **Multistate outbreak of listeriosis linked to blue bell creameries products (Final Update)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html>>. Acesso em: 22/07/2015.

CHAE M.S., SCHRAFT H., HANSEN L.T. and Mackereth R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, v. 23, p. 250-259, 2006.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D.M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **LWT. Food Science and Technology**, Oxford, v.40, p.249–254, 2007.

CHMIELEWSKI R.A.N, FRANK J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 22-32, 2003.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Minho, 186p., 2004.

CIEVS– CENTRO DE INFORMAÇÕES E RESPOSTAS ESTRATÉGICAS DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. 2012. **Informe epidemiológico**. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/InformeSE192012.pdf>. Acesso em: 09/06/2015.

CHRISTIANSSON, A. The toxicology of *Bacillus cereus*. **Bull. International Dairy Foods Association**, v.275, p.30-35, 1992.

COSTERTON J.W., ANDOWSKI Z., DEBEER D., CALDWELL D., KORBER D., JAMES G. Biofilms, the customize microniche. **Journal of bacteriology**, v. 176, n.8, p.2137-2142, 1994.

COSSART, P., AND M. LECUIT. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. **Embo Journal**, v. 17, p. 3797-3806, 1998.

COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.

COTTER, P. D., C. HILL, AND R. P. ROSS. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. **Current Protein & Peptide Science**, v. 6, p. 61-75, 2005.

COTTON, L. N.; WHITE, C. H. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in dairy plant environments. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.75, n.1, p.51-57, 1992.

COX, L. J.; KLEISS, T.; CORDIER, J.L.; CORDELLANAC, KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R. SIEBENGA, A. *Listeria* spp in food processing, non-food, and domestic environments. **Food Microbiology**, London, v.6, n.1, p. 49-61, 1989.

CULLER, J.S. Risks and prevention of contamination of dairy products. **Revue scientifique et technique**, v. 16, n. 2, p. 472-481, 1997.

DAT N.M., HAMANAKA D., TANAKA F., UCHINO T. Control of milk pH reduces biofilm formation of *Bacillus lincheformis* and *Lactobacillus paracasei* on stainless steel. **Food Control**, v. 23 p.215-220, 2012.

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

DAVIS J.A., FARRAH S.R., WILKIE A.C. Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavine-supplemented mannitol salt agar. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 606-11, 2006.

DI BONAVENTURA, G., R. PICCOLOMINI, D. PALUDI, V. D'ORIO, A. VERGARA, M. CONTER, AND A. IANIERI. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal and Applied Microbiology**, v. 164, p. 1552-1561, 2008.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology: Fundamental and Frontiers**. ASM Press. 3th ed. 1038p., 2007.

DURLU-OZKAYA F., XANTHOPOULOS V., TUNAIL N., LITPOPOULOU-TZANETAKI E., Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk, **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861–870, 2001.

ESPER, L. M.R.; KABUKI, D. Y; KUAYE, A. Y.. Qualidade microbiológica de ricotas comerciais e os riscos associados à presença de *Listeria monocytogenes*. **Revista Institucional do Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 554-559, 2011.

ESPER, L.M.R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas - SP**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, 97p. 2006.

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

FAO – **Milk and Milk Products**. Disponível em: < <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-and-milk-products/en/#.VFqLNvnF-So>> Milk Processing > Acesso em: 05/11/2014.

FDA - ***Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp.** Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook
Disponível em:
<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070492.htm>. Acesso em: 09/06/2015.

FERNANDES M. S. ***Enterococcus* spp. e *Bacillus cereus* isolados do processamento de ricota: patogenicidade, formação de biofilmes multiespecie e detecção de autoindutores ai-2**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas 2014.

FERNANDES M.S., 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 M.S.; 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 Journal Dairy**, v. 38, p.16-23, 2014.

FIGUEIREDO, E. A. T. Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C". Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 100p., 2000.

FLINT S.H.; BREMER P.J.; BROOKS J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant-description current concerns and methods of control. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 11.n.1, p. 1029-2454, 1997.

FLETCHER M. The Defect of proteins on bacteria attachment to polystyrene. **Journal of General Microbiology**, v. 94, p. 400-404, 1976.

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

FRANK, J. F., & YOUSEF, A. E. Tests for groups of microorganisms. In H. Wehr, & J. F. Frank (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products** American Public Health Association, Washington, DC, USA, 17th ed, p. 227-248 2004.

FRANZ C. M.A.P, HOLZAPFEL W. H.; STILES M.E. *Enterococci* at the crossroads off food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 1-24, 1999.

FORSYTHE, S. J.; HAYES, P.R., **Food hygiene, microbiology and HACCP**.3 ed. [S.l.] Aspen Publishers, 1998.

GALVEZ, A., H. ABRIOUEL, R. L. LOPEZ, AND N. BEN OMAR. Bacteriocin based strategies for food biopreservation. Int. **Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GELSOMINO R., VANCANNEYT M., COGAN T.M.; CONDON S., BALANCS J. Source of *Enterococci* in a farmhouse raw-milk cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3560-3565, 2002.

GIBSON, H.; TAYLOR J.H. HALL K.E.; HOLAH J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, p.41–48, 1999.

GIRAFFA G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GNANOU BESSE, N., A. BEAUFORT, S. RUDELLE, C. DENIS, AND B. LOMBARD. Evaluation of an enumeration method for *Listeria monocytogenes* at low contamination levels in cold-smoked salmon. **Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 271-274, 2008.

GOMES B.C., ESTEVES C.T., PALAZZO I.C.V., DARINI C.A.L., FELIS G.E., SECH L.A., FRANCO D.G.M., MARTINIS E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 668-675, 2008.

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.

GRAVANI, R. **Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities.** In: *Listeria, listeriosis and food safety*, 2nd ed. Ryser, E.T., and E.H. Marth (ed.), Marcel Decker, New York, p. 657–709, 1999.

GUILLIER, L., V. STAHL, B. HEZARD, E. NOTZ, AND R. BRIANDET. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. Int. **Journal of Food Microbiology**, v 128, p. 51-57, 2008.

HABIMANA, O., MEYRAND, M., MEYLHEUC, T., KULAKAUSKAS, S., BRIANDET, R., Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7814 -7821, 2009.

HAMID K., FATEN K., SOUMYA E., SAAD I.K., HASNA M., HASSAN L., MOKTAR H. *Bacillus cereus* Adhesion: Real Time investigation of the Effect on the Chemistry on Industrial Stainless Steel. **Microbiology**, v. 82, n. 1, p.22-28, 2013.

HENSEN, S.M., PAVIĆIĆ MJ, LOHUIS JA, DE HOOG JA, POUTREL B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1966-1975, 2000.

HELKE, D. M.; SOMERS, E. B.; WONG, A.C. L. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to Stainless Steel and Buna-N in the Presence of Milk and Individual Milk Components **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 6, p. 479-484, 1993.

HORNSTRA L.M.; LEEW P.L.A; MOEZELAAR R.; WOLBERT E.J.; VRIES Y.P; VOS W.M; ABEE T. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 367-371, 2007.

HOOD S.K. ZOTTOLA E.A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 60, p.1034-103, 1997.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema de recuperação de informações – SIDRA**. Homepage IBGE, Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 32 de maio 2015.

- IRIE, Y., PARSEK, M. R. Quorum sensing and microbial biofilms. In T. Romeo (Ed.), **Bacterial biofilms**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p. 67-84, 2008.
- IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes**. Publicado em 18/11/2005, Revisto em 03/04/2008. Disponível em < <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=354&ordem=2>>. Acesso em 25 de julho de 2015.
- JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th ed. p. cm. — (Aspen food science text series), p.419, 2008.
- JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEGDE, N.V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 3561-3573, 2004.
- JAVED. A., MASUD T., AIN Q.U., IMRAN M., MAQSOOD S. Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. **Annals of Microbiology**, v. 61, p.699-708, 2011.
- KABUKI, D.Y., KUAYE A.Y., WIEDMANN, M., BOOR. K.J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.9, p.2803-2812, 2004.
- KABUKI, D.Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo frescal tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular**. Tese (Doutorado) apresentado a Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 145f., 2004.
- KABUKI, D. Y.; SOUZA, A.Y.; KUAYE, A. Y. ***Bacillus cereus* potencialmente enterotoxigênico em queijos Minas frescal produzidos por diferentes processos tecnológicos**. II SIMTEC Simpósio de Profissionais da Unicamp, Campinas, SP, 29 de setembro a 01 de outubro de 2008.
- KAGKLI D.M. VANCANNEYT M., HILL C. VANDAMME P. COGAN T. M. *Enterococcus* and *Lactobacillus* Contamination of raw milk in a farm dairy environment. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n. 2, p. 243-251, 2007.
- KNIGHT, G. C., NICOL, R. S., & MCMEEKIN, T. A. Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 305-318, 2004.
- KIM, S., BANG, J., KIM, H., BEUCHAT, L.R., RYU, J.H. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on stainless steel upon exposure to *Paenibacillus polymyxa* biofilms. **Int. Journal of Food Microbiology**, v.167, p.328–336, 2013.
- KOMATSU, RS, APARECIDA, M., RODRIGUES, M., BORGES, W., Loreno, N. e SANTOS, KA. Occurrence of *Staphylococcus* coagulase positive in fresh Minas cheese produced in Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v.26, p. 316-321, 2010.

- KUMAR C. G., ANAND S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.
- LERICHE V., CARPENTIER B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p.594- 605, 2000.
- LEDENBACH L.H., MARSHALL R.T. Microbiological spoilage of dairy products. Ed. Sperger W.H., Doyle M.P. **Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages**. Griffin, GA, USA Springer, p. 41-67, 2009.
- LEE S.H.I., CAMARGO C.H., GONÇALVES J.L., CRUZ A.G., SARTORI B.T., MACHADO M.B., OLIVEIRA C.A.F. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7377-7383, 2012.
- LEMON, K. P., HIGGINS, D. E., KOLTER, and R. Flagellar Motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 4418-4424, 2007.
- LINDSAY D.; BROZEL V.S. VON HOLY. A. Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. **Journal Food Protection**, v. 69, n.5, p.1168-72, 2006.
- LIU, L., P. O'CONNOR, P. D. COTTER, C. HILL, AND R. P. ROSS. Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1059-1066, 2008.
- LOESSNER M.J., BELL R.H., JAY J.M., SHELEF L.A. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* Spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p.3003-3007, 1998.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia**. 10 ed. Editora Pearson/Prentice Hall. 624 p., 2004.
- MAFU, A. A., D. ROY, J. GOULET, AND L. SAVOIE. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1969-1973, 1991.
- MARQUES, E. B. **Estudo da formação de biofilme em superfícies abióticas: influência de cátions divalentes e ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis***. 136f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 136f., 2004.
- MARCHAND S., JONHE V., COOREVITS A. HEYNDRICKX 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.

MARTINS I. M., KABUKI D.Y., KUAYE A.K. Determination and characterization of pathogens found in dairy product. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 359–365, 2009.

MARTINS I.M., KABUKI D.Y., MIYA N.T.N., PEREIRA J.L. Occurrence and characterization of enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* isolated from dairy products. **Journal of Food Safety**, v. 34, p.185-192, 2014.

MANSSON, H.L. Fatty acids in bovine milk fat. **Food & Nutrition Research**, v. 52: p. 1821-1823 2008.

MEAD, P.S., L. SLUTSKER, V. DIETZ. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 5, p. 607–625, 1999.

MICHU, E.; CERVINKOVA D.; BABAK V.; KYROVA A.; JAGLIC Z. Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of ica-mediated biofilms. **International Dairy Journal**, v.21, p.179-184, 2011.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, p.34-41, 2003.

MONTANEZ-IZQUEIRDO V.Y., SALAS-VÁZQUEZ D.I., RODRIGUES-JEREZ J.J. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. **Food Control** v. 23, p. 470-477, 2012.

MOSSEL, D. A. A., KOOPMAN, M. J. AND JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 650–653, 1967.

MUNDAI E.A; BEHRAVESH C.B.; GOULD L.H. Increase outbreaks associated with non-pasteurized milk, United States, 2007-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, 2015. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/pdfs/14-0447.pdf>> acesso em 06/07/2015.

NELSON, J. H. Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.10, n.6, p. 344-345, 1990.

NYGUEN H.D.N., YANG Y.S.; YUK H.G. Biofilm formation of *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT – Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 383-388, 2014.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88 p.512–520, 2000.

OGIER J.C., SERRO P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 291-301, 2008.

- OH D.H; MARSHALL D.L. Monolaurin and acetic acid inactivation of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel. **Journal Food Protection**, v. 59, p. 249-252, 1996.
- OMOE, K., HU D.L., TAKAHASHI O.H, NAKANE A., SHINAGAWA K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.246, n.2, p.191-198, 2005.
- O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.
- OLIVER S.P., JAYARÃO B.M, ALMEIDA R.A. Foodborne pathogen in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.2, n. 2, p. 115-29, 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.30-15, 2012.
- PALMER J., FLINT S., BROOKS J. Bacterial cell attachment, the beginning of biofilm. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 577-588, 2007.
- PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.
- 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, p. 901-908, 2001.
- PASTORIZA, L., CABO, M.L., BERNÁRDEZ, M., SAMPEDRO, G., HERRERA, J.R., Combined effects of modified atmosphere packaging and lauric acid on the stability of precooked fish products during refrigerated storage. **European Food Research and Technology**, v.215, p.189–193, 2002.
- PERESI J.T.M, ALMEIDA I.A.Z.C., TEIXEIRA I.S.C., LIMA S.I., CARNICEL F.A., HOFFMANN F. L. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**; v. 63, n. 2, p. 232-237, 2004.
- PICIOREANU C., MARK C. M. V.L., HEIJNEN J.J. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 205-218, 2001.
- PASVOLSKY R., ZAKIN V. OSTROVA L. SHEMESH M. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* Species. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 19:27, 2014.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI O.D JR., VIDAL-MARTINS, A.M.C., AMARAL, L.A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p. 1563-1569, 2007.

RYSER; DONNELLY. In Downes and Ito (ed.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, Washington, D.C., 4th Ed, 2001.

ROCHA, J.A.K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo minas frescal**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. 89f. 2004.

RODRIGUES D.A., FRANCO B.D.G.M., LANDGRAF M., DESTRO M.T. Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 87-92. 2003.

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

ROSADO, M. S. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes**. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 84f, 2009.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). 3.ed. **Listeria, listeriosis and food safety**. Boca Raton: CRC Press, Chap. 1, p.1-20, 2007.

SALO S, EHAVALD H, RAASKA L, VOKK R, WIRTANEN G. Microbial surveys in Estonian dairies. **LWT – Food Science Technology**, v.39, n.5, p.460–71, 2006.

SCANNAPIECO, F. A., MILLAR, S. J., REYNOLDS, H. S., ZAMBON, J. J., & LEVINE, M. J. Effect of anaerobiosis on the surface ultrastructure and surface proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Haemophilus actinomycetemcomitans*). **Infection and Immunity**, v. 55, n. 9, p. 2320–2323, 1987.

SHARMA M, ANAND SK. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, v.19, n.6, p. 627–36, 2002.

SCHLEGELOVA, J., BABAK, V., HOLASOVA, M., KONSTANTINOVA, L., NECIDOVA, L., SISAK, F. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. **Czech Journal of Food Science**, v. 28, p. 450-461, 2010.

SOLANO C., MAITE E., IGO L. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, p. 96–104, 2014.

STAPPER A.P., NARASIMHAN G., OHMAN D.E., BARAKAT J., HENTZER M., MOLIN S., KHARAZMI A., HOIBY N., MATHEE K. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, n.7, p.679–690, 2004.

SMOOT L.M., PIERSON M.D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scottt A to food contact surfaces. **Journal of food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1293-1298, 1998.

STANLEY P. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p. 1493-1499, 1983.

STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in Biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p. 199-210, 2008.

STEPANOVIC, S., CIRKOVIC, I., MIJAC, V., & SVABIC-VLAHOVIC, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, p. 339- 343, 2003.

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

SOMERS EB, SCHOENI JL, WONG ACL. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p.269–76, 1994.

SOUTO, L. I. M. **Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 84f. , 2006.

SPEERS J.G.S, GILMOUR A. The Influence of milk and milk Components on the attachment of bacterial to farm dairy equipment surfaces. **Journal Applied Bacteriology**, v. 59, p.325-332, 1985.

STOODLEY P., WILSON S., HALL-STOODLEY L., BOYLE J.D., LAPPIN-SCOTT H.M., COSTERTON J.W. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v 67, n. 12, p. 5608–5613, 2001.

STOODLEY P, SAUER K, DAVIES DG, COSTERTON JW. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p.187–209, 2002.

TELGEMANN, U.; HORN, H.; MORGENROTH, E. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. **Water Research**, v.38, p. 3671-3684, 2004.

TORTORA G.J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. **Microbiologia**. 10ª edição. Editora Artmed, p.513, 2012.

TRABULSI L.R. ALTERTHUM F.- **Microbiologia**, Editora Atheneu, p. 720, 2005.

- TRAVAGIN, B. N. F. S. **Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 98f., 2010.
- VAN N., P.; MOOSDIJK, A.; HOENSEL, P.; MOSSEL, D.A.A.; PERALES, I. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriology** v.69, p. 73-79, 1990.
- VAN A. G., HARACEMIV S. M. C., MASSON M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, Dec. 2006 .
- VATANYOOPAISARN, S., A. NAZLI, C. E. DODD, C. E. REES, AND W. M. WAITES. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Applied and Environmental Microbiology**, v .66, p.860-863, 2000.
- VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de Quorum Sensing em biofilmes formados por bactérias psicrófilas isoladas de leite.** 2006. 176f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 176 f., 2006.
- VOS P., GARRITY , G., JONES , D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINEY F.A., SCHLEIFER , K.-H., WHITMAN , W. (EDS.) **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology** – Second Edition – Volume Three. Editora, Springer. 2009.
- WAAK E., THAM W., DANIELSSON-THAM M-L. Prevalence and fingerprinting of *listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n.7, p.3366–70, 2002.
- WATNICK P., KOLTER R. Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p.2675-2679, 2000.
- WIEDMANN M, WEILMEIER D, DINEEN SS, RALYEA R, BOOR KJ. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. Habi. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2085–95, 2000.
- WINJMAN J.G.E., 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.
- WIRTANEN, G., HUSNARKM U., MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p.727-733, 1996.
- WONG A.C. Biofilms in food processing environments. **Journal Dairy Science**, v. 811, p. 2765-2770, 1998.

ZECCONI, A., HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **The International Dairy Federation**, v. 345, p. 15-18, 2000.

ZOTTOLA H.J. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH value. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1549-1552, 1988.

ZOTTOLA, E.A. Reflections on Salmonella and other “wee beasties” in foods. **Food Technology**, v.55, n. 9, p.60-67, 2001.

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

Anexos

Anexo 1 – Meios de cultura

- ✓ 1.**MYP**: Agar manitol gema de ovo polimixina é utilizado para contagem e isolamento das espécies de *Bacillus*. O meio tem como fonte de nitrogênio, carbono e vitamina, o extrato de carne e a peptona. A fonte de hidratos de carbono é o D-manitol. A fermentação é detectada pelo indicador de pH vermelho fenol. As bactérias que utilizam o manitol formam colônias amarelas devido à produção de ácidos a partir do manitol e as que não utilizam o manitol produzem colônias rosa. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. A emulsão de gema de ovo favorece a produção de lecitinase, formando uma zona de precipitação branca ao redor das colônias. A solução de polimixina B, inibe o crescimento de várias bactérias Gram negativas.
- ✓ 2.**KF**: Agar Streptococcus KF, tem como fonte de nitrogênio e carbono a digestão enzimática de tecido animal. O extrato de levedura fornece as vitaminas e oligoelementos necessários. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. O glicerofosfato de sódio é o agente tamponante. Maltose e lactose são os hidratos de carbono fermentáveis e metabolizados por estreptococos fecais. A azida de sódio é o agente seletivo, que inibe os organismos Gram-negativos. A formação de ácido é detectada pela mudança do indicador púrpura de bromocresol, de cor de púrpura para amarelo.
- ✓ 3.**BP**_: Agar Baird Parker é um meio moderadamente seletivo usado para isolar e enumerar *Staphylococcus aureus*. É um meio parcialmente

seletivo que aplica a capacidade que os estafilococos têm de reduzir o telurito a telúrio, produzindo colônias cinza escuro a preto. O cloreto de lítio e o telurito de potássio atuam como agentes seletivos. A gema de ovo auxilia a detecção da lecitinase através de aparecimento de zona opaca de precipitação da lecitina ao redor da colônia e a lipase que é observada através da formação de halo brilhante.

- ✓ **4.Palcam:** Também é conhecido como Agar Polimixina Acriflavina Cloreto de Lítio Ceftazidime Esculina Manitol. Usado para isolamento e identificação de espécies de *Listeria*. O meio é altamente seletivo devido à presença do cloreto de lítio, ceftazidime, polimixina B e hidrocloreto de acriflavina.
- ✓ **5.MSA:** Agar sal manitol é um meio caracterizado por ter uma concentração de sal de 7,5% que é quase dez vezes maior que a concentração comum de outros meios, e inibe a maioria dos micro-organismos com exceção dos estafilococos. O extrato de carne e peptonas fornecem os elementos essenciais de carbono, nitrogênio e enxofre. O manitol é adicionado para mostrar a capacidade de fermentação dos organismos. A produção de ácido, como o resultado da fermentação do manitol, característico de *S. aureus*, resulta na formação de colônias com uma zona amarela.
- ✓ **6.LPM:** Agar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam. O agar tem extrato de carne, peptona e caseína que são fontes de peptídeos e aminoácidos, que fornecem azoto para o crescimento dos micro-organismos. O cloreto de sódio é usado como equilíbrio osmótico. A glicina contribui para a recuperação da *Listeria*. O cloreto de lítio e feniletanol são incorporados para suprimir o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. O moxalactam é o suplemento usado para inibir estafilococos, bacilos e algumas espécies de *Proteus*.