

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

## ANDRÉIA MIHO MORISHITA HARADA

# Effect of dry sanitizing methods on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* biofilms

Avaliação da eficiência de métodos de sanitização a seco sobre biofilmes de Listeria monocytogenes e Bacillus cereus

CAMPINAS

2020

## ANDRÉIA MIHO MORISHITA HARADA

Effect of dry sanitizing methods on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* biofilms

Avaliação da eficiência de métodos de sanitização a seco sobre biofilmes de Listeria monocytogenes e Bacillus cereus

> Dissertation presented to the School of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Technology

> 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 Tecnologia de Alimentos.

Supervisora/Orientadora: MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANDRÉIA MIHO MORISHITA HARADA, E ORIENTADA PELA PROFESSORA DR(A). MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO.

## CAMPINAS

2020

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

H212e	Harada, Andréia Miho Morishita, 1992- Effect of dry sanitizing methods on <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> biofilms / Andréia Miho Morishita Harada. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.
	Orientador: Maristela da Silva do Nascimento. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.
	<ol> <li>Biofilmes. 2. Listeria monocytogenes. 3. Bacillus cereus. 4. Sanitização.</li> <li>Nascimento, Maristela da Silva do. II. Universidade Estadual de Campinas.</li> <li>Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</li> </ol>

## Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Avaliação da eficiência de métodos de sanitização a seco sobre biofilmes de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* Palavras-chave em inglês: Biofilms *Listeria monocytogenes Bacillus cereus* Sanitization Área de concentração: Tecnologia de Alimentos Titulação: Mestra em Tecnologia de Alimentos Banca examinadora: Maristela da Silva do Nascimento [Orientador] Dirce Yorika Kabuki Cecília Geraldes Martins Data de defesa: 07-07-2020 Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-8490-2009 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/0982275121864595

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maristela da Silva do Nascimento Universidade Estadual de Campinas Orientadora

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki Universidade Estadual de Campinas Membro Titular

Dra. Cecília Geraldes Martins Instituto Adolfo Lutz Membro Titular

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação e na Secretaria do Programa da Unidade.

"Não faz mal que seja pouco, o que importa é que o avanço de hoje seja maior do que o de ontem. Que nossos passos de amanhã, sejam mais largos que os de hoje"

Daisaku Ikeda

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Akemi, pelo apoio e amor incondicional, e que nunca mediu esforços para que eu conseguisse chegar até aqui.

A minha irmã Mayumi, por todo o carinho e disposição em me ajudar no que fosse preciso.

Ao meu pai Kaneyuki, que mesmo distante sempre me apoiou.

A minha avó Jitsuko e ao meu avô Masao (*in memoriam*) por todo o carinho e amor.

Ao meu namorado Victor por toda a ajuda, paciência, carinho e que sempre me acolheu nos melhores e nos piores momentos dessa jornada.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maristela pela paciência e orientação, e por não medir esforços para que este trabalho fosse realizado.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki e Dra. Cecília Geraldes Martins pela disponibilidade e contribuição.

Aos meus queridos amigos do laboratório de higiene: Aline, Ana Paula, André, Astrid, Diana, Flávia e Pamela por toda a ajuda, lágrimas, cafés e risadas compartilhadas! Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui!

Aos estagiários, Ana Julia, Mariana, Marina e José e em especial a Melissa e a Bia por toda a ajuda, dedicação e amizade!

As auxiliares de laboratório Leila e Sandra por toda a ajuda, amizade e carinho.

As minhas queridas amigas Naíma, Danielle e Vanessa por todo o apoio, carinho e que nunca me deixaram desistir, minha gratidão eterna!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo 132828/2018-9) pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que direta ou indiretamente contribuiram para que este trabalho fosse realizado o meu muito obrigada!

#### RESUMO

Biofilmes representam uma grande preocupação nas indústrias de alimentos. São estruturas resistentes e de difícil remoção. Indústrias processadoras de alimentos de baixa atividade de água necessitam empregar métodos de limpeza e sanitização a seco, a fim de se evitar a exposição de resíduos de alimentos à umidade, fator que favorece o desenvolvimento de micro-organismos com consequente formação de biofilmes. Listeria monocytogenes e Bacillus cereus são bactérias capazes de formar biofilmes e de sobreviver em produtos de baixa atividade de água. O presente trabalho avaliou a eficiência de protocolos de sanitização a seco (luz ultravioleta -UV-C, ozônio gasoso, ar quente, solução de álcool etílico 70% e um produto comercial) sobre biofilmes de *L. monocytogenes* e *B. cereus* formados em cupons de aço inoxidável (AI) e polipropileno (PP). A aplicação da solução de álcool etílico 70% (v/v) apresentou fraco desempenho frente a ambas as bactérias testadas. Não foram constatadas diferenças significativas (p>0,05) quanto às reduções ao longo do tempo para este tratamento, exceto a exposição de L.monocytogenes em PP após 30 min. Já a ação do produto comercial, denominado desinfetante a seco, resultou em reduções de biofilme de L. monocytogenes correspondentes a 3,44 e 2,65 log UFC/cm<sup>2</sup> em AI e PP, respectivamente. Em biofilme de B. cereus, as maiores reduções devido à ação do produto comercial ocorreram após 5 min em AI (1,08 log UFC/cm<sup>2</sup>) e 15 min em PP (0,62 log UFC/cm<sup>2</sup>). A aplicação de ar quente (90°C) em L. monocytogenes foi mais efetiva nos primeiros 5 min de tratamento em aço quando comparada ao PP. Já em biofilme de *B. cereus*, também foi constatada uma maior eficiência em aço, porém, sem diferença significativa (p>0,05). O material da superfície teve influência no desempenho da luz UV-C e do ozônio gasoso em biofilme de L. monocytogenes, onde as contagens de células viáveis em PP foram reduzidas abaixo do limite de detecção (<1,69 log UFC/cm<sup>2</sup>) nos primeiros 5 min, em ambos os tratamentos. A exposição à luz UV-C em biofilme de B. cereus apresentou-se como o método a seco mais eficaz em AI (2 log UFC/cm<sup>2</sup>). Já em PP, o melhor desempenho foi atribuído a ação do ozônio gasoso, com redução de 2,16 log UFC/cm<sup>2</sup> após 30 min. Biofilmes de *B. cereus* também foram expostos à solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L), com eficiência superior a todos os métodos a seco testados. Em geral, os protocolos de sanitização a seco avaliados, necessitam de longos períodos de aplicação a fim de se obter reduções significativas. Porém, o

uso combinado dos mesmos pode contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos de sanitização em ambientes de processamento de alimentos de baixa atividade de água.

Palavras-chave: biofilmes, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, sanitização a seco

#### ABSTRACT

Biofilm represents a substantial concern in the food industry. They are resistant structures that cannot be easily removed from surfaces. Low moisture food processing plants need to apply dry cleaning and sanitizing methods, in order to avoid exposing food residues to moisture, a factor that enhance the development of microorganisms with consequent biofilm formation. Listeria monocytogenes and Bacillus cereus are known for their ability to form biofilm and their survival in low moisture food has been reported. This study evaluated the efficiency of dry sanitizing protocols (ultraviolet light - UV-C, gaseous ozone, dry heat, 70% ethyl alcohol solution and a commercial product) on L. monocytogenes and B. cereus biofilms on stainless steel (SS) and polypropylene (PP) coupons. The 70% (v/v) ethyl alcohol solution exhibited poor performance against both tested bacteria. There was no significant difference (p>0.05) among the bacteria reductions throughout time, except for L. monocytogenes biofilm on PP at 30 min. The commercial product resulted in reductions of 3.44 and 2.65 log CFU/cm<sup>2</sup> of L. monocytogenes biofilm on SS and PP, respectively. On the other hand, for *B. cereus* biofilm, the greatest reductions occurred after 5 min on SS (1.08 log CFU/cm<sup>2</sup>) and 15 min on PP (0.62 log CFU/cm<sup>2</sup>). Dry heat treatment (90°C) on L. monocytogenes biofilm was more effective in the first 5 min on SS compared to PP. In addition, higher efficiency on B. cereus biofilm on SS was also observed, but without significant difference (p>0.05). The surface material influenced the performance of UV-C and ozone on L. monocytogenes biofilm on PP; after 5 min the sessile cell counts were reduced below the detection limit (<1.69 log CFU/cm<sup>2</sup>) in both treatments. For *B. cereus* biofilm, the UV-C was the most effective dry method on SS (2 log CFU/cm<sup>2</sup>) whereas on PP, the best performance was obtained with ozone, reduction of 2.16 log CFU/cm<sup>2</sup> after 30 min. B. cereus biofilm was also exposed to sodium hypochlorite solution (200 mg/L), which exhibited superior efficiency to all dry methods tested. In general, the dry sanitizing protocols required long periods of exposure to obtain significant reductions. Nevertheless, their combined use may contribute to the development of new sanitizing protocols for low moisture food processing plants.

Key-Words: biofilms, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, dry sanitizing

RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	19
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1. Biofilmes	21
1.1. Formação	21
2. Superfícies de formação	23
2.1. Aço Inoxidável	23
2.2. Polipropileno	24
3. Listeria monocytogenes	24
4. Bacillus cereus	26
5. Sanitização a seco	28
5.1. Luz ultravioleta (UV-C)	
5.2. Ar quente	31
5.3. Ozônio	32
5.4. Álcool etílico e isopropílico	34
Referências Bibliográficas	35
CAPÍTULO 2 - Efficacy of dry sanitizing methods on Listeria monocytogenes biofilm	s47
Abstract	48
1. Introduction	49
2. Experimental procedures	50
2.1. Inoculum preparation	50
2.2. Biofilm formation	
2.3. Dry sanitizing methods	51
2.3.1. UV-C irradiation	51
2.3.2. Dry heat	51
2.3.3. Ozone	52
2.3.4. Ethanol and commercial product	52
2.4. Quantification of sessile cells	52
2.5. Weibull Model	53
2.6. Statistical Analysis	53
3. Results	54
3.1. Dry sanitizing	54
3.2. Weibull Model	54

# SUMÁRIO

4. Discussion			
Acknowledgments			
References			
CAPÍTULO 3 - Effect of dry sanitizing methods on <i>Bacillus cereus</i> biofilm			
1. Introduction			
2. Experimental Procedures			
2.1. Bacterial strains			
2.2. Biofilm formation			
2.3. Sanitizing Procedures			
2.3.1. Sodium Hypochlorite			
2.3.2. Ozone			
2.3.3. Dry heat73			
2.3.4. UV-C radiation73			
2.3.5. Ethanol 70%73			
2.3.6. Commercial dry disinfectant73			
2.4. Enumeration of viable sessile cells			
2.5. Statistical analysis			
3. Results			
4. Discussion			
Acknowledgments			
Conflict of Interest			
References			
DISCUSSÃO GERAL			
CONCLUSÕES GERAIS			
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS			

## INTRODUÇÃO GERAL

Na indústria de alimentos, a formação de biofilmes é um grande problema a ser enfrentado devido à dificuldade de remoção das estruturas formadas. Logo, estes representam uma potencial fonte de contaminação que pode colocar em risco a saúde do consumidor. Além disso, os biofilmes podem prejudicar a transferência de calor e aumentar a taxa de corrosão, levando a perdas energéticas e de produção (VERRAN e JONES, 2000).

Equipamentos e tubulações apresentam cantos, sulcos, rugosidades, rachaduras e zonas de baixo fluxo conhecidas como zonas mortas, que facilitam a deposição de resíduos e consequentemente o desenvolvimento de microorganismos, como *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (NITSCHKE, 2006).

Dados da ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) demonstram um aumento significativo nos casos de listeriose durante o período de 2013 a 2017, onde foram reportados 2502 casos confirmados de listeriose apenas no ano de 2017. O maior surto de listeriose ocorreu recentemente na África do Sul, acometendo 1060 pessoas (ECDC, 2020).

O perigo associado à presença de *L. monocytogenes* em alimentos com alta atividade de água é conhecido e reportado com frequência (CDC, 2020), porém, existem poucas informações a respeito de sua presença em alimentos com baixa atividade de água. *Recalls* envolvendo produtos como amêndoas, pistache, macadâmia, *waffles*, pasta de amendoim, pipoca, carnes fermentadas entre outros, já foram relatados (BEUCHAT, MANN e ALALI, 2013; CFIA, 2019; EC, 2019; FDA, 2012; LY, PEREIRA e FARBER, 2019).

*Bacillus cereus*, também está frequentemente associada a surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). De acordo com a EFSA (*European Food Safety Authority*) de 2007 a 2014 foram reportados 6657 casos de intoxicação associados a 413 surtos nos países da União Européia, onde a maioria dos casos ocorreu pelo consumo de refeições prontas (27,6%) e produtos a base de cereais (10,9%) (EFSA, 2017). *B. cereus* ou seus esporos, que são resistentes a altas temperaturas, agentes de limpeza e sanitização, também já foram isolados em cereais prontos para consumo, semolina, trigo, arroz, temperos, leite em pó, fórmulas infantis, cacau, chocolate entre outros (GLASSET et al, 2016; KONUMA et al., 1988; LESLEY et al, 2013; ROWAN e

ANDERSON, 1997; SARRIAS, VALERO e SALMERON, 2002; TE GIFFEL et al., 1996).

Apesar de os alimentos ou ingredientes de baixa atividade de água (a<sub>w</sub>) serem historicamente caracterizados pelo baixo potencial de desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, estes podem sobreviver por meses e até anos nos tipos de produto mencionados (BEUCHAT, MANN e ALALI, 2013). A maioria dos estudos relacionados a alimentos com baixa a<sub>w</sub> possuem como alvo a *Salmonella*, uma vez que surtos envolvendo a bactéria nessa classe de produtos aumentaram nos últimos anos (ANDERSON et al., 2017; MARTINEZ et al., 2015).

Todavia, visto que bactérias como *L monocytogenes* e *B. cereus* são capazes de sobreviver em produtos de baixa a<sub>w</sub> e formar biofilme (DOIJAD et al, 2015; MOSQUERÁ et al, 2014; PEÑA et al., 2014; SALUSTIANO et al., 2010; SKOVAGER et al., 2013), é essencial a aplicação de um processo de higienização adequado tanto em linhas de processamento úmidas quanto secas para que não ocorra o surgimento de focos de contaminação no ambiente fabril e no produto final.

Bactérias associadas a biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes a substâncias antimicrobianas (TOMIMAHA, NISHI e ARAI, 2007). Assim, métodos normalmente empregados no processo de higienização podem não ser eficientes na erradicação dos biofilmes. Em indústrias processadoras de alimentos secos ou com baixa atividade de água, a aplicação de métodos de sanitização a seco é essencial para evitar que o produto ou resíduos do mesmo não sejam expostos à umidade, tornando-os mais susceptíveis a eventuais contaminações microbiológicas (CODEX, 2015). Quando realizada a etapa de sanitização, normalmente são empregadas soluções de sanitizantes químicos que geram resíduos químicos e demandam um grande volume de água, tornando o processo de higienização mais longo.

Estudos de aplicação de métodos de sanitização a seco em superfícies de alimentos, embalagens e no ambiente de produção são encontrados na literatura (AKBAS e OZDEMIR, 2006; HAMIDI-OSKOUEI, JAMES e JAMES, 2015; MCKINNEY et al., 2009; SHAH et al., 2011; SOMMERS, SITES e MUSGROVE, 2010; VARGA e SZIGETI, 2016). Contudo, dados sobre o efeito em biofilmes formados por *L. monocytogenes* e *B. cereus* são escassos

(FAGERLUND et al., 2020; KIM, MOON e KIM, 2019; MARINO et al., 2018; NICHOLAS et al., 2013).

Assim, métodos de sanitização a seco podem representar uma alternativa aos métodos úmidos convencionais com menor impacto ambiental e custo operacional. Além disso, sua aplicação em indústrias processadoras de alimentos de baixa atividade de água elimina a introdução de métodos úmidos indesejáveis neste ambiente de processo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 41, n. 5, p. 513-519, 2006.

ANDERSON, N. M. et al. *Salmonella* inactivation during extrusion of an oat flour model food. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 738-743, 2017.

BEUCHAT, L. R.; MANN, D. A.; ALALI, W. Q. Efficacy of sanitizers in reducing *Salmonella* on pecan nutmeats during cracking and shelling. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 5, p. 770-778, 2013.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY (CFIA). Food recall warnings and allergy alerts. Disponível em: https://www.inspection.gc.ca/food-recall-warnings-and-allergy-alerts/eng/1351519587174/1351519588221. Acesso em: 20 jan. 2020.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Listeria* Outbreaks. Disponível em: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html. Acesso em: 20 jan. 2020.

CODEX. Code of Hygienic Practice for Low-Moisture Foods. CAC/RCP 75-2015.

DOIJAD, S. P. et al. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. **PLoS One**, v. 10, n. 9, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC). RASFF Portal – Notifications List. Disponível em: https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/. Acesso em: 20 jan. 2020.

FAGERLUND, A.; HEIR, E.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes* Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents. **Molecules**, 25(792), 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Archive for recalls, market withdrawals & safety alerts. Disponível em: http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ArchiveRecalls/default.htm. Acesso: em 20. set 2018. GLASSET, B. et al. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterization. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 48, 2016.

HAMIDI-OSKOUEI, A. M.; JAMES, C.; JAMES, S. The efficiency of UVC radiation in the inactivation of *Listeria monocytogenes* on beef-agar food models. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 231-236, 2015.

KIM, H. et al. Efficacy of chemical sanitizers against *Bacillus cereus* on food contact surfaces with scratch and biofilm. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 581-590, 2019.

KONUMA, H. et al. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat product additives. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 4, p. 324-326, 1988.

LESLEY, M. B. et al. Presence of *Bacillus cereus* sl from ready-to-eat cereals (RTE) products in Sarawak. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 1031-1034, 2013.

LY, V.; PARREIRA, V. R.; FARBER, J. M. Current understanding and perspectives on *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 18-24, 2019.

MARINO, M. et al. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2024, 2018.

MARTINEZ, B. et al. Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 to internal tissues and its survival on flowering heads of wheat. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 3, p. 518-524, 2015.

MCKINNEY, J. et al. Dose of UV light required to inactivate *Listeria monocytogenes* in distilled water, fresh brine, and spent brine. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 10, p. 2144-2150, 2009.

MOSQUERA-FERNÁNDEZ, M. et al. Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 182, p. 26-36, 2014.

NICHOLAS, R. et al. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 555–564, 2013.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa, Embrapa Agroindústria de Alimentos. Embrapa - CTAA, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

PEÑA, W. E. L. et al. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 153-158, 2014.

ROWAN, N. J.; ANDERSON, J. G. Maltodextrin stimulates growth of *Bacillus cereus* and synthesis of diarrheal enterotoxin in infant milk formulae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1182-1184, 1997.

SALUSTIANO, V. C. et al. Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1478-1483, 2010.

SARRIAS, J. A.; VALERO, M.; SALMERÓN, M. C. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. **Food Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 589-595, 2002.

SHAH, N. N. A. K. et al. Application of gaseous ozone to inactivate *Bacillus cereus* in processed rice. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 6, p. 2220-2232, 2011.

SKOVAGER, A. et al. Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to fine polished stainless steel under flow conditions is determined by prior growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 1, p. 35-42, 2013.

SOMMERS, C. H.; SITES, J. E.; MUSGROVE, M. Ultraviolet light (254 nm) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 2, p. 470-479, 2010.

TE GIFFEL, M. C. et al. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) Bacillus

*cereus* on farms in the Netherlands. In: **Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk, Wolfpassing**, Austria 13-15 March 1996. Proceedings. International Dairy Federation, p. 40-45, 1996.

TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 193-196, 2007.

VARGA, L.; SZIGETI, J. Use of ozone in the dairy industry: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 2, p. 157-168, 2016.

VERRAN J.; JONES, M. Industrial biofouling. New York: John Wiley and Sons Ltd.; 2000.

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficiência de métodos de sanitização a seco sobre biofilmes de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus.* 

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Verificar a formação de biofilme a partir de um *pool* de três cepas de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável e polipropileno;
- Avaliar o efeito de cinco métodos de sanitização a seco sobre biofilme formado por três cepas de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável e polipropileno;
- Determinar a cinética de inativação através do modelo Weibull de biofilme de *L. monocytogenes* submetido a diferentes protocolos de sanitização a seco;
- Verificar a formação de biofilme a partir de um *pool* de três cepas de *B. cereus* em cupons de aço inoxidável e polipropileno;
- Avaliar o efeito de cinco métodos de sanitização a seco sobre biofilme formado por três cepas de *B. cereus* em cupons de aço inoxidável e polipropileno;
- Comparar a eficiência dos métodos de sanitização a seco e de um método úmido (hipoclorito de sódio 200 mg/L) sobre biofilme de *B. cereus*.

**CAPÍTULO 1** 

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 

## 1. Biofilmes

A maior parte da atividade bacteriana na natureza não ocorre devido a células planctônicas, livres ou em suspensão, mas sim a comunidades sésseis em estruturas conhecidas como biofilmes (BERLANGA e GUERRERO, 2016). Estima-se que 90% dos micro-organismos vivam sob a forma de biofilmes (DONLAN, 2002). Biofilmes podem ser definidos como estruturas dinâmicas de comunidades microbianas, mono ou multi-espécies, aderidas em superfícies bióticas ou abióticas e envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, conhecida como EPS (*Extracellular Polymeric Substances*). A matriz de EPS, além de conferir propriedades de aderência, também aumenta a resistência a antibióticos e sanitizantes (DONLAN, 2001; FUROWICZ et al., 2010; HARMSEN et al., 2010; STEWERT e COSTERTON, 2001).

## 1.1. Formação

Sadekuzzaman et al. (2015) descrevem o processo de formação de biofilmes em cinco etapas (Figura 1). Inicialmente ocorre a adesão reversível das células em superfície biótica ou abiótica, por meio de interações fracas como forças de van der Waals. Em seguida, ocorre a etapa de adesão irreversível onde forças de interação mais fortes (hidrofílicas/hidrofóbicas) ocorrem por meio de estruturas como proteínas, flagelos e fímbrias. Inicia-se então, a produção da matriz exopolissacarídica, constituída basicamente por polissacarídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) extracelular, formando assim a estrutura de um biofilme. Esta, passa então a desenvolver canais de distribuição de água, nutrientes e moléculas de sinalização. Por fim, ocorre o desprendimento de células individuais ou agregados e a dispersão dos mesmos, podendo colonizar outras superfícies e criar novos focos de contaminação.



Figura 1. Etapas da formação de biofilmes Fonte: Sadekuzzaman et al. (2015)

Estudos de Gilbert et al. (1991) e Vatanyoopaisarn et al. (2000) concluíram que a adesão irreversível em superfícies leva de 20 minutos a no máximo 4 horas.

Diversos fatores influenciam a formação de biofilmes. Em relação ao meio em que se formam, podemos citar o pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, tipo de escoamento no caso de meios fluidos, presença de compostos antimicrobianos e presença de cátions. Já em relação a características das células, podem influenciar: a hidrofobicidade da superfície celular, a presença de apêndices e substâncias poliméricas extracelulares e moléculas de sinalização. Existem ainda fatores relacionados às características das superfícies que podem ser determinantes para a adesão, como sua composição, rugosidade, porosidade, hidrofobicidade entre outros (PEREIRA et al., 2000; SIMÕES et al., 2010).

#### 2. Superfícies de formação

Os materiais utilizados na indústria de alimentos devem ser cuidadosamente estudados e escolhidos, de maneira a garantir que estes suportem as condições empregadas e permitam um processo de higienização adequado. O aço inoxidável é o material mais frequentemente utilizado em equipamentos na indústria de alimentos. Porém, o polipropileno também vem sendo empregado na construção de tanques, tubulações, acessórios e superfícies de corte (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

#### 2.1. Aço Inoxidável

Aços inoxidáveis (AI) são classificados como aços de alta liga à base de ferro e níquel, cuja característica anticorrosiva é predominantemente resultante do elemento cromo (10,5% a 26%). A adição de molibdênio também auxilia na resistência à corrosão. Eles podem ser classificados em cinco categorias de acordo com a AISI (*American Iron and Steel Institute*): austeníticos, ferríticos, martensíticos, endurecíveis e duplex (SILVA et al, 2011; TELLES, 2003).

Dentre os austeníticos se encontra o aço tipo 304 que é altamente empregado na indústria de alimentos. Como principais vantagens na utilização deste aço, podemos citar: sua elevada resistência à corrosão, facilidade de ser trabalhado e moldado, facilidade de limpeza e manutenção e a alta resistência mecânica e a meios agressivos. Contudo, sua principal desvantagem é ser um dos materiais mais caros dentre os metais (TEBECHERANI, 2011). O acabamento é um importante aspecto a ser considerado na especificação do material, uma vez que este influencia o processo de adesão de bactérias, devido a topografia e características físicoquímicas. O *US 3-A Sanitary Standard* 01-07 (1990) especifica que superfícies em contato com alimentos requerem acabamento nº4. Além disso, valores de rugosidade menores ou iguais a 0,8 µm são recomendados para aço inoxidável (EHEDG, 2018).

## 2.2. Polipropileno

O polipropileno (PP) é produzido a partir da polimerização do propeno, um hidrocarboneto insaturado contendo somente átomos de carbono e hidrogênio, o que torna o PP um polímero de caráter hidrofóbico (ALMADA, 2006; KWON, HUSSAIN e OH, 2004). Sua resistência química pode ser classificada como excelente frente a soluções diluídas ou concentradas de ácidos, álcoois e bases, boa para aldeídos, ésteres, hidrocarbonetos alifáticos, cetonas e limitada para hidrocarbonetos halogenados ou aromáticos e agentes oxidantes. É um polímero leve, com densidade correspondente a 0,90 g/cm<sup>3</sup>, o que o torna atrativo para as mais diversas aplicações (MADDAH, 2016). Além disso, é um polímero de fácil processabilidade, boa resistência a umidade, razoável ductilidade com boa rigidez e baixo custo em comparação com outros polímeros (MANRICH, 2004).

#### 3. Listeria monocytogenes

O gênero *Listeria* atualmente compreende 17 espécies, sendo que apenas duas, *Listeria ivanovii* e *Listeria monocytogenes*, são consideradas patogênicas para ruminantes e humanos, respectivamente (SCALLAN et al., 2011). Contudo, *L. ivanovii* já foi associada a casos de gastroenterite em humanos (GUILLET et al., 2010). *L. monocytogenes* é a espécie que causa maior preocupação, visto que é um dos mais importantes patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos, amplamente distribuída no ambiente. Existem 13 sorotipos diferentes sendo 1/2a, 1/2b e 4b frequentemente isoladas em doenças humanas (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007). A maioria dos surtos de listeriose é causada pelo sorotipo 4b (NICHOLAS et al., 2013).

São caracterizadas como pequenos bastonetes Gram-positivos, anaeróbias facultativas, não esporuladas, móveis em meio sólido a 20-25°C, flageladas, com 0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a 2 µm de comprimento. Possuem atividade de água (a<sub>w</sub>) ótima >0,97, com mínima entre 0,90 e 0,93. Possuem temperatura ótima de crescimento na faixa de 30-37°C, com um mínimo de 1-2°C e máximo de 45°C, além de serem capazes de se desenvolver em uma faixa de pH que varia de 4,7 a 9,2. São capazes ainda de tolerar concentrações salinas superiores a 10%, sobrevivendo a 25,5% de NaCI (HUI et al., 2000; RYSER e MARTH, 1999; YOUSEF e CARLSTROM, 2003).

*L. monocytogenes* pode causar aborto em mulheres grávidas, septicemia e infecção do sistema nervoso central (meningite e encefalite) em neonatos, idosos e pacientes imunocomprometidos (PILCHOVÁ et al., 2014). Um fato que chama a atenção, é sua elevada letalidade que acomete aproximadamente 20-30% dos infectados (SCALLAN et al., 2011). Recentemente foram reportados surtos envolvendo produtos prontos para consumo à base de produtos cárneos, queijos e ovos cozidos, sendo que todos os casos acarretaram na morte de pelo menos um indivíduo (CDC, 2019; EFSA, 2019).

Sua entrada no ambiente fabril pode ocorrer devido a matérias-primas, pessoas ou equipamentos (SIMÕES, SIMÕES e VIEIRA, 2010). A presença de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos é frequentemente relatada em pisos, paredes, drenos, tubulações, esteiras, equipamentos e até mesmo no ar (DI CICCIO et al., 2012; FERREIRA et al., 2014). Isso é atribuído a sua capacidade de sobrevivência em condições adversas e de formação de biofilmes (GANDHI e CHIKINDAS, 2007).

*L. monocytogenes* é capaz de aderir, colonizar e formar biofilmes em diversos materiais frequentemente encontrados na indústria de alimentos, como em aço inoxidável, poliestireno, polipropileno, vidro, borracha e outros (KOCOT e OLSZEWSKA, 2017; RIPOLLES-AVILA et al., 2018). A associação com outras bactérias pode aumentar ainda mais sua resistência. Estudos de Norwood e Gilmour (2000) concluíram que a concentração de cloro necessária para se obter uma redução significativa em biofilmes *de L. monocytogenes, Pseudomonas fragi* e *Staphylococcus xylosus,* foi 100 vezes maior, se comparada a uma cultura planctônica.

Fatores como a presença de flagelos, proteínas associadas a adesão, comunicação intercelular e o DNA extracelular também desempenham um importante papel na formação de biofilmes (KOCOT e OLSZEWSKA, 2017).

Maiores taxas de aderência são observadas em cepas persistentes isoladas de indústrias de alimentos (PALMER et al., 2007). A presença de *L. monocytogenes* já foi relatada em diversos produtos como: frutos do mar, produtos lácteos, carnes, frutas, queijos, sorvetes, vegetais congelados, aves e principalmente em produtos prontos para o consumo (CDC, 2018).

Autoridades da área de segurança de alimentos, baseados na análise de risco realizada pela FAO/OMS (2004) estabeleceram limites para *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo. O *FDA (Food and Drug Administration)* e o *FSIS (Food Safety and Inspection Service)* por exemplo, possuem a política de tolerância zero. Já a legislação européia preconiza um limite de tolerância de 10<sup>2</sup> UFC/g (EC, 2005). No Brasil, a Instrução Normativa nº 60 da ANVISA estabelece diferentes limites de acordo com a categoria de alimentos prontos para consumo, podendo variar de 10<sup>2</sup> UFC/ 25 g ou mL a ausência em 25 g ou mL (BRASIL, 2019).

Estudos mostram que a bactéria é capaz de sobreviver por longos períodos mesmo em produtos de baixa atividade de água, como por exemplo em: leite em pó desnatado, amendoim, pasta de amendoim, nozes, amêndoas, pistache, fórmulas infantis e farinha de trigo (BRAR et al., 2015; DOYLE, MESKE e MARTH, 1985; KENNEY e BEUCHAT, 2004; KIMBER et al., 2012; KOSEKI, NAKAMURA e SHIINA, 2015; TAYLOR et al., 2018).

Kimber et al. (2012) avaliaram amostras de amêndoas cuja contagem inicial de 4,4 log UFC/g não apresentou diferença significativa após 12 meses a - 19°C e 4°C. Kenney e Beuchat (2004) observaram em manteiga de amendoim que a redução de um inóculo inicial de 4,42 log UFC/g para 0,62 log UFC/g ocorreu somente após 24 semanas a 20°C. Já Taylor et al. (2018) reportaram uma redução de apenas 2,5 log UFC/g em farinha de trigo (a<sub>w</sub> 0,31) durante 210 dias a 22°C, além de constatar o aumento da resistência térmica dos mesmos.

## 4. Bacillus cereus

O grupo Bacillus cereus inclui 8 espécies: Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus cytotoxicus, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bacillus thuringiensis, Bacillus weihenstephanensis e Bacillus toyonensis (EHLING-SCHULZ et al., 2019).

São caracterizados como bastonetes, Gram-positivos, com comprimento variando de 3-5 µm e largura de 1-2 µm, anaeróbios facultativos e móveis (na maioria das cepas), sendo detentores de flagelos peritríquios. Multiplicam-se a uma temperatura ótima na faixa de 28-35°C, com mínimo entre 4 e 7°C e máximo de 43°C. São capazes de se desenvolver em ambientes com valores de pH, variando de 4,9 a 9,3 e concentrações salinas em torno de 7,5%

(ICMSF, 1996; KOTIRANTA, LOUNATMAA e HAAPASALO, 2000; KRAMER e GILBERT, 1989; VATANYOOPAISARN et al., 2000). *B. cereus* são amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados no solo, na poeira, em pelos de animais e na água. Além disso, são frequentemente encontrados em alimentos crus como vegetais e temperos, ingredientes como a farinha e alimentos secos como cereais e leite em pó (ICMSF, 1996; RYU e BEUCHAT, 2005). Surtos envolvendo semolina e temperos já foram reportados (GLASSET et al., 2016; VAN DOREN et al., 2013).

*B. cereus* são capazes de produzir dois tipos de toxinas: a emética e a diarreica (BOTTONE, 2010; LUO et al., 2016; VALERO et al., 2006). A toxina emética, denominada cereulida, é termoestável e causa sintomas como náuseas, vômitos, mal-estar e raramente diarréia. Caracteriza-se por um curto período de incubação, que normalmente varia entre 1 e 6 horas (AGATA, OHTA e YOKOYAMA, 2002; GRANUM, 1994). Já a síndrome diarreica ocorre devido as enterotoxinas que provocam diarréia e dores abdominais de 8 a 16 horas após a ingestão (SONI et al., 2016).

No Brasil, de 2000 a 2015, *B. cereus* foi o quarto patógeno mais frequentemente associado a surtos de origem alimentar (3,1%). Porém, vale ressaltar que na maioria dos casos (58,5%) não foram realizadas investigações epidemiológicas a fim de se determinar os micro-organismos associados aos surtos (LENTZ et al., 2018).

Estudos com biofilmes de *B. cereus* já demonstraram sua capacidade de adesão em materiais como aço inoxidável, vidro e borracha (HAYRAPETYAN et al., 2016), o que representa um grande problema para a indústria de alimentos. Estudos de Wijman et al. (2007) relataram que 12,4% da microbiota constituinte de biofilmes de plantas de laticínios são representadas por *B. cereus*. Sua adesão inicial em superfícies acaba formando uma camada pré-condicionante, facilitando a adesão de outras bactérias (MARCHAND et al., 2012).

A espécie também é caracterizada por produzir esporos resistentes a altas temperaturas e a agentes de limpeza e sanitização, sendo de difícil eliminação (PENG, TSAI e CHOU, 2001; SMITH et al., 2004; TEWARI e ABDULLAH, 2014). Além disso, forma esporos quando em biofilme (FAILLE et al., 2014; HAYRAPETYAN et al., 2015), os quais podem representar até 90% da contagem (WIJMAN et al., 2007). Esporos são fortemente aderidos a superfícies, devido à presença de proteínas do exospório (SONI et al., 2016). Podem sobreviver em alimentos e em ambientes de processamento de produtos secos por longos períodos, podendo germinar e crescer em produtos reconstituídos não propriamente processados ou estocados. Um estudo conduzido com cereal infantil constatou que células vegetativas de *B. cereus* sobreviveram a estocagem a 5, 25, 35 e 45°C por 36 semanas, não sendo afetadas pela atividade de água (0,27 – 0,78) e pH (5,6 e 6,7) (JAQUETTE e BEUCHAT, 1998).

## 5. Sanitização a seco

O processo de higienização inclui duas etapas fundamentais: a limpeza e a sanitização. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por carboidratos, proteínas, gorduras e sais minerais. A sanitização, por sua vez, tem como objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de saprófitas a níveis considerados seguros (ANDRADE, 2008). A aplicação do método de sanitização deve garantir a redução de 5 ciclos logarítmicos, que equivale a uma redução de 99.999% (FDA, 2017).

Ambas as etapas devem ser realizadas com rapidez e regularidade para remover e eliminar efetivamente as bactérias em estágio inicial de adesão, impedindo a contaminação das matérias-primas e dos produtos acabados, além de proteger a saúde dos consumidores (MAFU et al., 2010).

Falhas nos procedimentos de higienização permitem que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os micro-organismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular (PARIZZI et al. 2004)

Sanitizantes como os compostos clorados, quaternários de amônia e ácido peracético, classificados como adequados pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2009), são frequentemente utilizados devido à fácil aplicação, boa penetração, ação rápida, baixo custo e amplo espectro de ação frente a bactérias, fungos e vírus (GAULIN et al., 2011). Porém, durante os procedimentos de rotina, as bactérias podem se tornar menos sensíveis ou até mesmo resistentes a compostos antimicrobianos devido à exposição contínua a concentrações subletais (TO et al., 2002). O uso constante desses sanitizantes tem contribuído para o desenvolvimento de micro-

organismos resistentes. A suscetibilidade reduzida por adaptação fenotípica, alteração ou aquisição genética aumenta a probabilidade de falha no processo de higienização. Assim, a presença de biofilmes na indústria de alimentos pode representar um reservatório de disseminação de genes resistentes a compostos antimicrobianos, o que pode levar a sérios problemas de saúde pública (CHAPMAN, 2003; LANGSRUD et al., 2003; LINDSAY, BROZEL e VON HOLY, 2006). Além disso, a utilização de sanitizantes químicos faz com que sejam necessárias etapas de enxágue, o que demanda um grande volume de água e um maior tempo para realização da etapa de sanitização, além da geração de resíduos químicos e do risco de contaminação do produto se não realizado o enxágue adequado.

É importante ressaltar que a avaliação da eficiência de sanitizantes normalmente é feita por meio de testes de laboratório, sem levar em consideração a produção de EPS, um dos principais fatores que confere resistência às bactérias em um biofilme (CASTRO et al., 2017). Assim, estudos aplicados a biofilmes são de fundamental importância a fim de se obter resultados mais realistas e condizentes com a realidade presente nas indústrias.

Os ambientes de produção e estocagem de produtos como leite em pó, fórmulas infantis, farinhas, amendoim, pasta de amendoim entre outros, são comumente submetidos à limpeza a seco. Marriot et al. (2018) recomendam o uso de aspiradores com filtros acoplados, seguido da aplicação de álcool etílico 70%. Contudo, existem outros métodos de sanitização a seco que podem ser empregados, como radiação: luz UV-C, luz pulsada, ionização catalítica radiante, micro-ondas, ar quente, ozônio gasoso, dióxido de cloro e plasma (ALMATROUDI et al., 2018; GRINSHPUN et al., 2007; LEE et al., 2017; MAHDI et al., 2019; NAM et al., 2014; RAJKOVIC et al., 2010; SHIKANO et al., 2017; SOMMERS et al., 2010).

## 5.1. Luz ultravioleta (UV-C)

A radiação ultravioleta (UV) pode ser subdividida em quatro faixas: UV-A (320 a 400 nm), UV-B (280 a 320 nm), UV-C (200 a 280 nm) e UVvácuo (100 a 200 nm). Dentre essas subdivisões, a radiação UV-C apresenta maior potencial de inativação de micro-organismos, como mostra a Figura 2. Os comprimentos de onda entre 250 e 270 nm são absorvidos pelos ácidos nucleicos das células, causando danos ao DNA e ao RNA (KOWALSKI, 2009).



Figura 2. Eficiência germicida em função do comprimento de onda Fonte: (Sharma, 1999)

Bintsis et al. (2000) dividem as aplicações do efeito germicida da luz UV-C em três categorias: a primeira se refere a inativação de microorganismos em superfícies como embalagens e tampas; a segunda aplicação está relacionada à descontaminação do ar; e a terceira à descontaminação de líquidos. Na Europa são comumente utilizados na indústria de bebidas e água, uma vez que não ocorre a produção de compostos de sabor ou odor (MARRIOTT et al., 2018).

A aplicação da luz UV-C é uma tecnologia aprovada pelo FDA que pode ser utilizada para inativar patógenos em água, alimentos líquidos, superfícies de alimentos e superfícies que entrem em contato com alimentos (SOMMERS et al., 2010). Porém, o baixo poder de penetração da radiação é uma limitação do método. Além disso, resíduos de alimentos, por exemplo, podem conferir efeito protetor aos micro-organismos (BERNBOM, VOGEL e GRAM, 2011; KUDA et al., 2012; SHIKANO et al., 2017). Bernbom et al. (2011) avaliaram o efeito da radiação UV-C em biofilme de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável inoculados em diferentes substratos: caldo tripticase de soja (TSB) suplementado com glicose, TSB com adição de 5% de cloreto de sódio (NaCl) e extrato de salmão defumado. Após 2 minutos, a contagem inicial de 5,91 log UFC/cm<sup>2</sup> no cupom inoculado com TSB e glicose, foi reduzida abaixo do limite de detecção do método (1,90 log UFC/cm<sup>2</sup>). A presença do cloreto de sódio fez com que a contagem fosse reduzida abaixo do limite de detecção após 10 minutos de exposição e o cupom inoculado com extrato de salmão não apresentou diferença significativa após 10 minutos, o que demostra o efeito protetor conferido por resíduos de alimentos.

Bae e Lee (2012) avaliaram o efeito da radiação UV-C (0,235 mW/cm<sup>2</sup>) na inativação de células aderidas de *L. monocytogenes* em AI e PP. Após 30 minutos e 3 horas de exposição foram observadas reduções, em cupons de aço, de 0,84 e 2,18 log/cupom respectivamente. Já em PP, a redução foi de 0,71 log/cupom após 30 minutos e 1,91 log/cupom após 3 horas. Estudos também são realizados com bactérias capazes de formar esporos como B. cereus. Gayán et al. (2013) avaliaram o efeito da radiação UV-C na inativação de esporos de Bacillus coagulans, Bacillus cereus, Alicyclobacillus acidocaldarius, Bacillus licheniformis е Geobacillus stearothermophilus alcançando reduções de 2,25; 2,93; 3,24; 3,85 e 4,05 log respectivamente.

## 5.2. Ar quente

A aplicação de calor pode ser utilizada tanto como parte do processamento de alimentos quanto como uma alternativa de sanitização. O ar quente age através da oxidação dos componentes químicos das bactérias e pela desidratação das mesmas. Contudo, sua ação é mais lenta e menos efetiva que o calor úmido (SCHMIDELL et al., 2001; TORTORA et al., 2010). O método, utilizado na área médica, é aplicado no interior de cabines específicas de fácil instalação e baixo custo e é recomendado para materiais

que são danificados pelo calor úmido. É um método atóxico e que não gera resíduos. Rutala et al. (2008) descrevem dois modos de aplicação: o estático, com funcionamento semelhante a uma estufa e o de ventilação forçada, onde o ar quente circula por toda a cabine.

Não foram encontrados estudos com aplicação de ar quente em biofilmes de *L. monocytogenes* ou *B. cereus.* Um sistema de ventilação forçada foi testado por Almatroudi et al. (2018) em biofilme de *Staphylococcus aureus* sujeito a etapas intermitentes de desidratação. Após exposição a 80°C/60 min e 100°C/10 min foram obtidas reduções de 0,12 e 0,88 log respectivamente. Já McKelvey e Bodnaruk (2013) avaliaram o efeito de um sistema estático a 90°C em espécies de *Salmonella* em aço inoxidável. Após 4 horas foi observada uma redução de 4,3 log UFC/cupom.

## 5.3. Ozônio

O ozônio é um gás incolor com odor característico que se decompõe em oxigênio sem geração de resíduos (GRAHAM, 1997). É um produto resultante do rearranjo de átomos após as moléculas de oxigênio serem submetidas a uma descarga elétrica, onde os radicais livres de oxigênio reagem com o oxigênio diatômico (O<sub>2</sub>) formando as moléculas de oxigênio triatômicas (O<sub>3</sub>). A formação desses radicais pode se dar através da exposição à radiação UV e pelo efeito corona (KIM et al., 1999). É um poderoso agente oxidante. Quando comparado ao cloro, seu potencial oxidante é aproximadamente 2 vezes maior. Ele age inicialmente nas glicoproteínas, glicolipídeos e em alguns aminoácidos, como o triptofano da membrana celular e também nos grupos sulfidrilas de certas enzimas, afetando a atividade normal das células. Além disso, também ataca ácidos nucléicos resultando em danos ao DNA (MEGAHED, ALDRIDGE e LOWE, 2018).

Em 2001, o FDA aprovou o uso do ozônio como agente antimicrobiano para o tratamento, estocagem e processamento de alimentos, podendo ser usado tanto na fase aquosa como gasosa (FDA, 2001).

Sua estabilidade varia em função da temperatura, do pH e da presença de materiais oxidáveis. Em fase aquosa seu tempo de meia vida

corresponde a aproximadamente 20 minutos a 20°C. Após esse período, é novamente convertido a uma molécula de oxigênio. Já em estado gasoso, é estável por aproximadamente 12 horas (MEGAHED, ALDRIDGE e LOWE, 2018).

Sua aplicação é limitada devido a sua toxicidade, uma vez que pode causar dores de cabeça, irritação no sistema respiratório e até mesmo efeitos irreversíveis letais em altas concentrações (CULLEN e NORTON, 2012). O padrão de exposição ocupacional (*Occupational Exposure Standard* - OES) nos países da União Europeia é de 0 a 2 ppm calculando em média por um período de 15 minutos (NICHOLAS et al., 2013). Além disso, a fim de se garantir a segurança no ambiente de trabalho, seu uso requer um sistema de detecção e de inativação térmica ou catalítica (KIM et al., 1999).

Marino et al (2018) testaram a eficiência de ozônio gasoso em biofilme *de L. monocytogenes* em cupons de aço e obtiveram contagens abaixo do limite de detecção (<10 UFC/cm<sup>2</sup>) após exposição por 2 min a 2 ppm. Nicholas et al. (2013) também avaliaram o efeito de ozônio gasoso (45 ppm) em biofilme de *L. monocytogenes*. Após 1h foram obtidas reduções de 0,56 e 0,90 log UFC/cm<sup>2</sup> em superfícies de AI e PP respectivamente.

Shah et al. (2011) avaliaram o efeito do ozônio gasoso na inativação de *B. cereus* em arroz e obtiveram reduções de 3,6 log UFC/g após exposição por 420 min a 0,4 ppm.

Akbas e Ozdemir (2008) avaliaram o efeito do ozônio gasoso no controle de *E. coli, B. cereus* e esporos de *B. cereus* em figos secos. Após 360 min a 1 ppm houve redução de 3,5 log UFC/g na contagem de células viáveis de ambas as bactérias e de até 2 log UFC/g para esporos. Os mesmos autores também conduziram um estudo semelhante em pistache, obtendo reduções de 3,5 e 3 log UFC/g para *E. coli* e *B. cereus* respectivamente (AKBAS e OZDEMIR, 2006).

## 5.4. Álcool etílico e isopropílico

Álcoois são bastante utilizados na sanitização de superfícies. Álcool etílico e álcool isopropílico possuem ação bactericida e são amplamente empregados na área médica e em domicílios (GILBERT e MCBAIN, 2003; MCDONNELL e RUSSELL, 1999). A ação desses agentes resulta no rompimento das membranas celulares e desnaturação proteica. Além disso, existem evidências de que sua ação também afeta o metabolismo celular e a síntese de proteínas (BOYCE, 2018).

Álcool etílico 70% é comumente utilizado como agente antimicrobiano (BLOCK, 2001). Porém, estudos de Redelman et al (2012) demonstram que o tratamento com álcool em biofilme de *Staphylococcus aureus* contribuiu para a transcrição de genes promotores de biofilmes.

Já o isopropanol é frequentemente associado a compostos quaternários de amônia (QA). McEgan e Danyluk (2015) avaliaram a eficiência de um sanitizante QA e outro associado ao álcool isopropílico (QA+IP) na inativação de *Salmonella* spp., *E. coli* e *L. monocytogenes* em pistache. As cascas previamente inoculadas foram misturadas com o sanitizante, água ou álcool etílico 70% e a contagem foi feita imediatamente ou após 48h a 30°C. Nenhum dos tratamentos resultaram em efeito imediato sobre *Salmonella* ou *E.coli*. Já em *L. monocytogenes* houve redução imediata nas amostras tratadas com QA e QA+IP reduzindo as contagem foi reduzida abaixo do limite de detecção (<1 log UFC/g). Após 48 horas, a contagem foi reduzida

Cronin e Wilkinson (2008) estudaram a resposta fisiológica de células vegetativas de *B. cereus* sob ação de diversos tratamentos, dentre eles o do álcool isopropílico 70%. Corantes fisiológicos (lodeto de Propídeo e SYTOX *green*) foram utilizados para se medir a permeabilidade da membrana. Células tratadas com álcool isopropílico foram permeáveis a ambos os corantes, indicando danos a membrana celular. Além disso, altos níveis de ATP foram detectados indicando vazamento de material pela membrana danificada.

#### **Referências Bibliográficas**

AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 23-27, 2002.

AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli, Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 386-391, 2008.

AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 513-519, 2006.

ALMADA, F. C. Avaliação das condições de moldagem por injeção nas propriedades mecânicas de blendas de reator de polipropileno. 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

ALMATROUDI, A. et al. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are more resistant to heat treatment than traditional hydrated biofilms. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, n. 2, p. 161-167, 2018.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos** - Avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008.

BAE, Y. M.; LEE, S. Y. Inhibitory effects of UV treatment and a combination of UV and dry heat against pathogens on stainless steel and polypropylene surfaces. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 61-64, 2012.

BERNBOM, N.; VOGEL, B. F.; GRAM, L. *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 69-73, 2011.

BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry–a critical review. **Journal** of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 6, p. 637-645, 2000.

BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization, and preservation**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.

BRAR, P. K. et al. Survival of *Salmonella, Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* on raw peanut and pecan kernels stored at -24, 4, and 22°C. Journal of Food Protection, v. 78, n. 2, p. 323-332, 2015.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa N° 60, de 23 de Dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4660474/IN\_60\_2019\_.pdf/8b764b8f-5172-4bfc-a855-bc73972ee96f. Acesso em: 22 jul. 2020.

CASTRO, M. R. et al. Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 9-16, 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Listeria* Outbreaks. Disponível em: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html. Acesso em: 31 out. 2018.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and coresistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271-276, 2003.

CRONIN, U. P; WILKINSON, M. G. Physiological response of *Bacillus cereus* vegetative cells to simulated food processing treatments. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 11, p. 2168-2176, 2008.

CULLEN, P. J.; NORTON, T. **Ozone sanitisation in the food Industry**. In: O'DONNELL, C. et al. (Ed.). Ozone in food processing. John Wiley & Sons, 2012.

DI CICCIO, P. et al. *Listeria monocytogenes*: biofilms in food processing. Italian Journal of Food Science, v. 24, n. 3, 2012.
DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DOYLE, M.; MESKE, L. M; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 9, p. 740-742, 1985.

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. **The** *Bacillus cereus* **group**: *Bacillus* species with pathogenic potential. Microbiol Spectrum 7(3):GPP3-0032-2019.

EUROPEAN HYGIENIC ENGINEERING & DESIGN GROUP (EHEDG). Hygienic **Design Principles** Doc 8. 3 ed. 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC). No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 338, p. 1-26, 2005.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2019. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 infections linked to ready-to-eat meat products – 25 November 2019.

FAILLE, C. et al. Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. **Food Microbiology**, v. 40, p. 64-74, 2014.

FDA. Food and Drug Administration. Food Code. U.S. Department Of Health And Human Services, 2017.

FDA. Food and Drug Administration. Hazard analysis and critical control point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule, Federal Register, 66: 6137-6202. 2001.

FERREIRA, V. et al. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 150-170, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Benefits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food production and food processing. 2009.

FUROWICZ, A. J. et al. Bacterial biofilm as well as other microbial elements and mechanisms of survival in extreme conditions. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 66, n. 7, p. 444-448, 2010.

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

GAULIN, C. et al. Disinfectants and sanitizers for use on food contact surfaces. National Collaborative Centre for Environment Health. 2017.

GAYÁN, E.; ÁLVAREZ, I.; CONDÓN, S. Inactivation of bacterial spores by UV-C light. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 140-145, 2013.

GLASSET, B. et al. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 48, 2016.

GILBERT, P. et al. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 72–77, 1991.

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 61S-66S, 1994.

GRINSHPUN, S. A. et al. Control of aerosol contaminants in indoor air: combining the particle concentration reduction with microbial inactivation. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 2, p. 606-612, 2007.

GUILLET, C. et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerging Infectious Diseases, v. 16, n. 1, p. 136, 2010.

GUINEBRETIÈRE, M. H, et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 851-865, 2008.

GURTLER, J. B.; DOYLE, M. P.; KORNACKI, J. L. The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices. New York, NY: Springer, 2014.

HARMSEN, M. et al. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 253-268, 2010.

HAYRAPETYAN, H. et al. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 72-79, 2015.

HUA, Z. et al. Comparative evaluation of different sanitizers *against Listeria monocytogenes* biofilms on major food-contact surfaces. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

HUI, Y. H.; SATTAR, S. A.; NIP, W. **Foodborne Disease Handbook:** Volume 2: Viruses: Parasites: Pathogens, and HACCP. CRC Press, 2000.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms In Foods 5**: Characteristics Of Microbial Pathogens. Springer Science & Business Media, 1996.

JAQUETTE, C. B.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1629-1635, 1998.

KENNEY, S. J.; BEUCHAT, L. R. Survival, growth, and thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in products containing peanut and chocolate. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2205-2211, 2004.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KIMBER, M. A. et al. Survival of Salmonella, Escherichia coli O157: H7, and Listeria monocytogenes on inoculated almonds and pistachios stored at -19, 4, and 24°C. Journal of Food Protection, v. 75, n. 8, p. 1394-1403, 2012.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. **LWT**, v. 84, p. 47-57, 2017.

KOSEKI, S.; NAKAMURA, N.; SHIINA, T. Comparison of desiccation tolerance among *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica*, and *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 1, p. 104-110, 2015.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 189-198, 2000.

KOWALSKI, W. (Ed.) Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for air and surface disinfection. Berlin: Springer, 2009

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other Bacillus. In: **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker New York, 1989. p. 21-70.

KUDA, T. et al. Resistances to UV-C irradiation of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in wet and dried suspensions on surface with egg residues. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 485-490, 2012.

KWON, M.; HUSSAIN, M. S.; OH, D. H. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 1103-1111, 2017.

KWON, O. J. et al. Surface characteristics of polypropylene film treated by an atmospheric pressure plasma. **Surface and Coatings Technology**, v. 192, n. 1, p. 1-10, 2005.

LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance - A challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 283-290, 2003.

LEE, T.; PULIGUNDLA, P.; MOK, C. Corona Discharge Plasma Jet Inactivates Foodborne Pathogens Adsorbed onto Packaging Material Surfaces. **Packaging Technology and Science**, v. 30, n. 10, p. 681-690, 2017.

LENTZ, S. A. M. et al. *Bacillus cereus* como principal agente etiológico em surtos de intoxicação alimentar no Sul do Brasil: dados de 11 anos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 4, 2018.

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

LUO, K. et al. A combined hurdle approach of slightly acidic electrolyzed water simultaneous with ultrasound to inactivate *Bacillus cereus* on potato. **LWT**, v. 73, p. 615-621, 2016.

MADDAH, H. A. Polypropylene as a promising plastic: a review. **American Journal** of **Polymer Science**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

MAFU, A. A. et al. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: influence of pH of culture. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, 2010.

MAHDI, A. B.; GOMES, C. Effects of microwave radiation on micro-organisms in selected materials from healthcare waste. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 3, p. 1277-1288, 2019.

MANRICH, S. Processamento de Termoplásticos: rosca única, extrusão e matrizes, injeção e moldes/Capitulo 5. Exemplo de Extrusão de um produto fabricado com Polímero Termoplástico. São Paulo: Artliber Editora, p. 235, 2005.

MARCHAND, S. et al. 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.

MARINO, M. et al. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2024, 2018.

MARRIOTT, N. G.; SCHILLING, M. W.; GRAVANI, R. B. Principles of Food Sanitation. Springer, 2018.

MCEGAN, R.; DANYLUK, M. D. Evaluation of aqueous and alcohol-based quaternary ammonium sanitizers for inactivating *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* on peanut and pistachio shells. **Food Microbiology**, v. 47, p. 93-98, 2015.

MCKELVEY, P. J.; BODNARUK, P. W. Survival of *Salmonella* species on stainless steel exposed to dry heat. **Internet Journal of Food Safety**, v. 15, p. 88-92, 2013.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MEGAHED, A.; ALDRIDGE, B.; LOWE, J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. **PIoS One**, v. 13, n. 5, 2018.

NAM, H. et al. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 122-127, 2014.

NICHOLAS, R. et al. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 555-564, 2013.

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**, v. 88, n. 3, p. 512-520, 2000.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.34, p.577-588, 2007.

PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology** and Technology, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PENG, J.; TSAI, W.; CHOU, C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 11-18, 2002.

PEREIRA, M. A. et al. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 181-186, 2000.

PILCHOVÁ, T. et al. Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 366-372, 2014.

POMPERMAYER, D. M. C; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000.

RAJKOVIC, A. et al. Pulsed UV light as an intervention strategy *against Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on the surface of a meat slicing knife. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 3, p. 446-451, 2010.

REDELMAN, C. V.; MADUAKOLAM, C.; ANDERSON, G. G. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 411-418, 2012.

RIPOLLES-AVILA, C. et al. Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. **Food Control**, v. 92, p. 240-248, 2018.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J.; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Center for Disease Control, 2008.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (3<sup>rd</sup> Ed.). *Listeria*: listeriosis, and food safety. CRC Press, 2007.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm Formation and Sporulation by *Bacillus cereus* on a Stainless Steel Surface and Subsequent Resistance of Vegetative Cells and Spores to Chlorine, Chlorine Dioxide, and a Peroxyacetic Acid-Based Sanitizer. **Journal of Food Protection**, v. 68, n.12, p. 2614-2622, 2005.

SADEKUZZAMAN, M. et al. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 491-509, 2015.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States—unspecified agents. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 16, 2011.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. vol. 2: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Blucher, 2001.

SHAH, N. N. A. K. et al. Application of gaseous ozone to inactivate *Bacillus cereus* in processed rice. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 6, p. 2220-2232, 2011.

SHAMA, G. Ultra-violet light. **Encyclopedia of Food Microbiology**. London, UK: Academic Press, p. 2208- 2214, 1999.

SHIKANO, A. et al. Effect of quantity of food residues on resistance to desiccation, disinfectants, and UV-C irradiation of spoilage yeasts adhered to a stainless steel surface. **LWT**, v. 80, p. 169-177, 2017.

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

SILVA, A. L. C.; MEI, P. R. Aços e Ligas Especiais. 3 ed. Edgard Blucher, 2011.

SMITH, J. P. et al. Shelf life and safety concerns of bakery products—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 19-55, 2004.

SOMMERS, C. H.; SITES, J. E.; MUSGROVE, M. Ultraviolet light (254 nm) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 2, p. 470-479, 2010.

SONI, A. et al. Bacillus spores in the food industry: a review on resistance and response to novel inactivation technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 6, p. 1139-1148, 2016.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

TAYLOR, M. H. et al. Stability of *Listeria monocytogenes* in wheat flour during extended storage and isothermal treatment. **Food Control**, v. 91, p. 434-439, 2018.

TEBECHERANI, C. de T. P. Aços inoxidáveis. Disponível em: http://www. pipesystem. com. br/artigos\_técnicos/aço\_inox. Acesso em: 25 jan. 2019.

TELLES, P.S. Materiais e equipamentos de processo. 6. ed. Rio de janeiro: Interciência, 2003.

TEWARI, A.; ABDULLAH, S. *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2500-2511, 2015.

TO, M. S. et al. Post adaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5258-5264, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

VALERO, M. et al. Modeling the influence of electron beam irradiation on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Food Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 367-371, 2006.

VAN DOREN, J. M. et al. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973–2010. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 456-464, 2013.

VATANYOOPAISARN, S. et al. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 860-863, 2000.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WIJMAN, J. G. E et al. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

YOUSEF, A. E.; CARLSTROM, C. Food Microbiology: a laboratory manual. Hoboken, N. J: John Wiley & Sons, 2003.

# **CAPÍTULO 2**

# Efficacy of dry sanitizing methods on *Listeria monocytogenes* biofilms

Andréia Miho Morishita Harada, Maristela da Silva do Nascimento

A ser submetido a revista Food Control

# Abstract

This study assessed the efficacy of five dry sanitizing treatments (dry heat, ultraviolet light - UVC, gaseous ozone, 70% ethanol and a commercial product) on Listeria monocytogenes biofilm. Coupons of two different materials were tested: stainless steel (SS) and polypropylene (PP). The 70% ethanol and the commercial product (quaternary ammonium compound + isopropyl alcohol) exhibited similar weak performance on both SS and PP, with the exception of the commercial product on SS at 30 min. An inactivation curve (log  $N/N_0$ ), characterized by two plateaus, was observed on SS after the dry heat treatment (90°C). However, there was no significant difference (p>0.05) throughout time. On PP, 30 min of exposure led to a reduction of 3.7 log CFU/cm<sup>2</sup>. The surface material influenced (p<0.05) the performance of UV-C light and gaseous ozone. On PP, L. monocytogenes sessile cells were reduced below the limit of detection (1.69 log CFU/cm<sup>2</sup>) within 5 min for both treatments. On SS, reductions up to 2.2 and 3.4 log CFU/cm<sup>2</sup> were observed for UV-C and ozone, respectively. According to the Weibull model, the time required to achieve 5-log reductions (t5d) was guite long (>49 min), with the exception of UV-C and ozone on PP (ca. 6 min). In conclusion, dry heat was the most effective treatment on SS, and gaseous ozone and UV-C on PP.

Keywords: Listeria monocytogenes, dry sanitizing, biofilm, food safety, food hygiene

#### 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is an ubiquitous pathogen often related to foodborne outbreaks associated with high water activity (a<sub>w</sub>) products such as meat, milk, fruits and vegetables (EFSA, 2017). The minimum a<sub>w</sub> for *L. monocytogenes* growth is 0.92. However, some studies have described its ability to survive in low a<sub>w</sub> products such as wheat flour, infant formulas and nuts (Brar, Proano, Friedrich, Harris & Danyluk, 2015; Kimber, Kaur, Wang, Danyluk & Harris 2012; Koseki, Nakamura & Shiina, 2015; Taylor, Tsai, Rasco, Tang & Zhu, 2018). Although there are no reports of *L. monocytogenes* outbreaks linked to these kinds of products, recalls have already happened (Ly, Parreira & Farber, 2019).

*L. monocytogenes* can survive for a long period of time in the food processing environment, especially in areas of difficult access (CODEX, 2007). Its ability to form biofilms on different surfaces such as stainless steel, polystyrene, polypropylene, glass, among others, is a key factor for its persistence in the food industry (Beresford, Andrew & Sharma, 2001; Rodríguez-Melcón, Riesco-Peláez, García-Fernández, Alonso-Calleja & Capita, 2019).

During the cleaning and sanitizing procedures, especially in low  $a_w$ food processing plants, it is important to avoid water insertion in the environment (Marriott, Schilling & Gravani, 2018). Thus, dry sanitizing methods can be a promising alternative. They consist in the application of dry heat, alcohol-based solutions, irradiation or gaseous agents. Furthermore, dry methods do not generate waste, reducing the environmental impact (Gurtler, Doyle & Kornacki, 2014). No studies regarding dry heat exposure of adhered cells or biofilms of L. monocytogenes were found. On the other hand, applications of ethanol, ultraviolet light (UV-C) and ozone individually have been reported. Reductions of 3 log CFU/cm<sup>2</sup> were achieved after 15 min of exposure to 75% ethanol on polyvinyl chloride (PVC) (Fagerlund, Heir, Møretrø & Langsrud, 2020). Bae and Lee (2012) evaluated the application of UV-C light on L. monocytogenes adhered cells for 30 min and obtained reductions of 0.84 and 0.71 log CFU/cm<sup>2</sup> on stainless steel (SS) and polypropylene (PP), respectively. Marino et al. (2018) obtained counts below the detection limit (<10 CFU/cm<sup>2</sup>) on SS after biofilm exposure to ozone (2 ppm) for 2 min.

Although *L. monocytogenes* is considered a potential hazard in the food industry, no comparative study of the efficiency of dry sanitizing methods on

its biofilm has been carried out. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of five dry sanitizing treatments (70% ethanol solution, the commercial product based on quaternary ammonium and isopropyl alcohol, dry heat, UV-C light and gaseous ozone) on *L. monocytogenes* biofilm formed on SS and PP coupons.

# 2. Experimental procedures

# 2.1. Inoculum preparation

A pool of three strains of *Listeria monocytogenes* was used: Scott A (human isolate, 4b), ATCC7644 (human isolate, 1/2c) and CLIST 4763 (food isolate, 1/2b). Stock cultures were stored in glass beads with trypticase soy broth (TSB, Difco, MD, USA), supplemented with 0.6% yeast extract (YE, Acumedia, MI, USA) and 15% glycerol at -80°C. For the inoculum preparation, strains were grown in TSB-YE broth at 37°C for 24 h. After that, a culture loop was streaked on trypticase soy agar (TSA, Difco, MD, USA), supplemented with 0.6% YE and incubated at 37°C for 24 h. Isolated colonies of each strain were diluted in 0.85% saline solution to obtain suspensions equivalent to 1.0 McFarland. A pool of the three strains was prepared by mixing an equal volume of each suspension.

# 2.2. Biofilm formation

The experiment was performed on AISI 304 stainless steel (SS) and polypropylene (PP) coupons (10 mm x 10 mm x 1 mm). The coupons were previously cleaned with neutral detergent, rinsed with distilled water and immersed in 70% (v/v) ethanol. After 1h, the coupons were rinsed again and maintained at room temperature to dry. Then the SS coupons were sterilized for 15 min at 121°C (Fernandes, Kabuki & Kuaye, 2015) and the PP coupons were exposed to UV-C in a laminar flow cabinet for 30 min each side. Biofilms were formed according to the method described by Buckingham-Meyer et al. (2007) with minor modifications. A filter paper (Whatman Qualitative Grade 2, Whatman, UK) was placed on a TSA-YE plate and inoculated with 1.5 mL of the *L. monocytogenes* pool (*ca.* 7 log CFU/mL). The plate was incubated for 7

days at 25°C, in order to simulate the temperature typically found in processing areas of low moisture food (CODEX, 2015). After 4 days, the filter was remoistened with 1.5 mL of TSB-YE.

# 2.3. Dry sanitizing methods

At the end of the incubation period, the SS and PP coupons were immersed in 10 mL of 0.85% saline solution for 1 min to remove planktonic cells and carefully transferred to a sterile petri dish exposing the surface in contact with a filter to dry for 10 min in a laminar flow cabinet. Then, the coupons were subjected to the dry sanitizing methods for 0, 5, 10, 15 and 30 min. Data obtained from previous tests showed that there was no significant difference (p>0.05) between sessile cell counts on two coupons of the same surface material (data not shown). All the experiments were performed three times.

# 2.3.1. UV-C irradiation

The coupons were placed in a sterile petri dish and exposed to the UV-C light 8W (OSRAM, GmbH, Italy) into an opaque dark box (30 x 15 x 15 cm). The light was positioned 15 cm above the coupons and the intensity determined by a radiometer (Maestro, Gentec, Canada) was 6.5 mW/cm<sup>2</sup>.

# 2.3.2. Dry heat

The coupons were placed in a sterile petri dish inside a glass box (30 x 15 x 19 cm). On the opposite side of the box, there was an air outlet covered with a filter (Millipore, Merck, Germany). A heat blower (Taiff, Brazil) with a continuous air flow at approximately 2.0 m/s was used to apply the dry heat perpendicularly to the coupon. The temperature was measured by a thermocouple (PT100, Testo, Germany) and maintained at  $90 \pm 2^{\circ}$ C.

#### 2.3.3. Ozone

This methodology was adapted from Moore et al. (2000). The coupons were placed in a sterile petri dish inside a hermetic acrylic box (37 x 27 x 25 cm). Ozone was produced by an ozone generator (Ozoxi, Brazil) and piped into the box, which also had an outlet pipe connected to an ozone destroyer (Ozoxi, Brazil). The ozone concentration was maintained at 45  $\pm$  2 ppm and monitored by an ozone analyzer (UV-100, EcoSensors, USA). Temperature and relative humidity (RU) were monitored through a sensor (AM2302/DHT22, Aosong, China) and maintained at approximately 25°C and 50% RU.

## 2.3.4. Ethanol and commercial product

The coupons were placed in a sterile petri dish and covered with a 70% (v/v) ethanol solution (45  $\mu$ L). After each tested time, the coupons were immersed in a neutralizing broth (Letheen broth (Acumedia, MI, USA)) supplemented with Tween 80 (Sigma Aldrich, Germany) for the same period of time (adapted from Rutala et al. 2008 and Chojecka et al. 2017). The same procedure was performed with a commercial dry disinfectant (didecyldimethylammonium chloride (0.015%), sequester, isopropyl alcohol (25%) and water, pH 7.1).

#### 2.4. Quantification of sessile cells

After 5, 10, 15 and 30 min of each treatment, the coupons were immersed in 5 mL of 0.85% saline solution and vortexed for 1 min to remove sessile cells. Decimal dilutions were prepared in peptone water 0.1% and spread plated on TSA-YE, followed by incubation at 37°C for 24 h (adapted from Giaouris et al., 2005). A control coupon non-submitted to any sanitizing treatment was for time zero. Typical colonies were confirmed by performing biochemical tests (Gram staining, Beta-haemolysis, L-Rhamnose, D-Xylose) (ISO 11290-1: 2017). The results were expressed as log CFU/cm<sup>2</sup>.

#### 2.5. Weibull Model

To describe the inactivation kinetics of attached cells, values (log CFU/cm<sup>2</sup>) obtained in each treatment throughout time were evaluated on fitting different inactivation models available at GInaFit (Geeraerd et al., 2005). Based on this preliminary analysis, the Weibull model (Mafart et al., 2002) was chosen as the most suitable (data not shown). This model is given by:

$$\log(N/N_0) = - (t/\delta)^{\beta}$$

*N* represents the microbial cell density (CFU/cm<sup>2</sup>) and  $N_0$  the initial microbial cell density (CFU/cm<sup>2</sup>). The Weibull model allows estimating the  $\delta$  value which is the decimal reduction time (time for the first decimal reduction), and  $\beta$  which is a shape parameter related to the curve concavity. Also, the time needed to achieve five log reductions (t<sub>5d</sub>) was estimated based on this model for most of the treatments and using linear interpolation for UV-C and ozone on PP. Regression coefficient (R<sup>2</sup>) and root mean squared error (RMSE) were used to access appropriateness of fit.

#### 2.6. Statistical Analysis

The reduction rate (log N/N<sub>0</sub>) of *Listeria monocytogenes* biofilm was analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test to determine whether there were significant differences (p<0.05) among the dry sanitization methods. Interaction among the treatments, surfaces and exposing time were also analyzed. SAS software (version 9.4, SAS Institute, Cary, NC) was used.

# 3. Results

# 3.1. Dry sanitizing

After seven days at 25°C the *L. monocytogenes* biofilm achieved 5.4 and 6.0 log CFU/cm<sup>2</sup> on SS and PP, respectively.

The 70% ethanol (v/v) performed similarly as the commercial product based on quaternary ammonia and isopropyl alcohol (p>0.05). In general, both treatments led to the smallest reductions on SS (Fig. 1A) and PP (Fig. 1B), except for the commercial product at 30 min on SS (3.4 log  $CFU/cm^2$ ).

The exposure of SS to dry heat (90°C) for up to 30 min resulted in two reduction stages of *L. monocytogenes* biofilm as shown in Fig.1A. The first one occurred after 5 min, with a slope of 2.4 log CFU/cm<sup>2</sup>, and the second one after 15 min, with a reduction of 3.3 log CFU/cm<sup>2</sup>. However, there was no significant difference between the times evaluated (p>0.05). On PP, on the other hand, reductions in the microbial load over the exposure time were observed (p<0.05), with a biofilm population of 4.5 log CFU/cm<sup>2</sup> after 5 min and 2.3 log CFU/cm<sup>2</sup> after 30 min (data not shown).

The type of surface material influenced (p<0.05) the performance of UV-C and gaseous ozone against the *L. monocytogenes* biofilm. The only exception was the 30-min treatment of ozone. On SS, the reductions ranged from 1.4 to 2.2 log CFU/cm<sup>2</sup> for UV-C light, and from 1.7 to 3.4 log CFU/cm<sup>2</sup> for ozone. Whereas on PP the counts decreased to below the limit of detection (<1.69 log CFU/cm<sup>2</sup>) after 5 min for both treatments (Fig 1B).

# 3.2. Weibull Model

After a previous analysis, the Weibull model was chosen to predict the fate of the *L. monocytogenes* biofilm during the dry sanitizing operations (Table 1). The R<sup>2</sup> values were greater than 0.94, indicating a good fit of the model to the data. Nevertheless, it was not possible to apply the model for UV-C and ozone on PP, since the counts reached the limit of detection during the first time interval (Fig. 1B).

	Coupon	δ (min) <sup>a</sup>	SE⁵	β <sup>c</sup>	SE <sup>d</sup>	t₅ <sub>d</sub> (min) <sup>e</sup>	R <sup>2<sup>†</sup></sup>	RMSE <sup>g</sup>
	SS	0.13*	0.29	0.22	0.10	168.1	0.970	0.331
Dry Heat	PP	1.68	0.46	0.46	0.04	54.2	0.996	0.119
	SS	3.00	1.24	0.14	0.03	2.5E+05	0.997	0.041
Ethanol	PP	5.51	0.77	0.52	0.04	122.2	0.998	0.062
Commercial Product	SS	8.27	4.39	0.90	0.32	49.6	0.943	0.418
	PP	6.89	1.41	0.68	0.08	73.5	0.993	0.121
UV-C	SS	2.54	1.33	0.32	0.07	388.8	0.988	0.130
	PP	$ND^{h}$	ND	ND	ND	6.1**	ND	ND
Ozone	SS	1.42	0.14	0.40	0.01	81.1	0.999	0.034
	PP	ND	ND	ND	ND	6.7**	ND	ND

**Table 1.** Parameters of Weibull model fitted for the *Listeria monocytogenes* biofilm after dry sanitizing treatments on stainless steel and polypropylene coupons.

\* Average measured values obtained from three independent trials

\*\* Linear interpolation data

<sup>a</sup> Time required for first decimal reduction (min)

 $^{\text{b}}$  Standard error of  $\sigma$  value

<sup>c</sup> Fitting parameter (shape of curve)

<sup>d</sup> Standard error β value

<sup>e</sup> Time required for 5 decimal reductions

<sup>f</sup> Regression coefficient

<sup>9</sup> Root mean square error

<sup>h</sup> Not determined

The  $\beta$  value, which defines the shape of the curve, ranged from 0.14 to 0.90, indicating concave upward death curves for the *Listeria monocytogenes* biofilm.

Required times for the first decimal reduction ( $\delta$  value) ranged from 0.13 to 8.27 and 1.68 to 6.89 min on SS and PP, respectively. The fastest reduction was predicted for dry heat and the slowest for the commercial product for both surface materials. However, comparing the experimental and predicted data, it was noticed that the model overestimates  $\delta$  value for the commercial product on SS.

The time required for 5-log reductions of *Listeria monocytogenes* biofilm ( $t_{5d}$ ) was also calculated based on the Weibull model. It ranged from *ca*. 50 min to 4206 h on SS (Fig. 2A). As mentioned before, for PP coupons the Weibull model was only applied for dry heat, ethanol and the commercial product. On this surface,  $t_{5d}$  values ranged from 54 to 122 min (Fig. 2B).

Nevertheless, in order to compare the performance of all treatments,  $t_{5d}$  values for UV-C and ozone on PP was calculated using linear interpolation, and the obtained values were 6.1 and 6.7 min, respectively.

# 4. Discussion

This is the first study that evaluated the effect of different dry sanitizing methods on a biofilm of a pool of three *L. monocytogenes* strains. These data serve as a useful reference for the food industry to design more effective dry sanitation protocols, especially in manufacturing plants of low moisture foods.

The static method described by Buckingham-Meyer et al. (2007) was chosen to perform the *L. monocytogenes* biofilm formation with the purpose to simulate an environment in which surfaces are not constantly exposed to wet condition. *L. monocytogenes* is normally classified as a species with low or intermediate capacity for biofilm formation (Kalmokoff et al., 2001; Reis-Teixeira, Alves & Martinis, 2017). Although, in this study, it was able to achieve sessile cell counts higher than 5 log CFU/cm<sup>2</sup>, corroborating Reis-Teixeira et al. (2017) results. Rooner and Wong (1993) considered 5.0 log CFU/cm<sup>2</sup> as the minimum value to characterize a biofilm. The initial count of the *L. monocytogenes* biofilm on SS was slightly lower than that obtained on PP (p>0.05), 5.4 log CFU/cm<sup>2</sup> versus 6.0 log CFU/cm<sup>2</sup>. A greater adhesion of *L. monocytogenes* on PP, when compared to SS, was reported in studies that performed other methods of biofilm formation (Saá, Cabo & Rodríguez, 2009; Skowron et al., 2018).

In general, the performance of the dry sanitizing methods was influenced (p<0.05) by the exposure time, except dry heat and 70% ethanol on SS. Meanwhile, the surface material influenced (p<0.05) the performance of two out of the five treatments evaluated, UV-C light and gaseous ozone.

The Weibull model (Table 1) predicted a non-linear kinetic decline ( $\beta$ <1) of *L. monocytogenes* biofilm population. Usually the fastest loss in the biofilm viability was noted in the first 5 min, followed by tail phases. It may be related to the stress adaptation ability (van Boekel, 2002), to the variability of the resistance among the tested strains (Carballo and Araújo, 2012; Martínez-Suárez, Ortiz & López-Alonso, 2016) or to the protection provided by the biofilm structure for the deeper layers (Epstein, Pokroy, Seminara & Aizenberg, 2011).

In this study, 70% ethanol performed poorly on both evaluated surfaces. On SS, a slight initial reduction was verified (1.0 log CFU/cm<sup>2</sup>) but there was no reduction increase throughout the exposure time. However, on PP, a gradual reduction was observed, reaching 2.38 log CFU/cm<sup>2</sup> after 30 min. Fagerlund et al. (2020) reported a better performance of 75% ethanol on *L. monocytogenes* biofilm on PVC surface, with reduction of *ca.* 3 log cycles after 15 min. It is known that the presence of organic material reduces the efficiency of sanitizing agents such as ethanol, since the interaction between them decreases the availability of the active compound (Boyce, 2018). In addition, proteins act as a diffusing barrier to the sanitizer (Rutala et al., 2008).

According to the manufacturer's recommendations, the commercial product based on a quaternary ammonia compound (0.015%) and isopropyl alcohol (25%) should be in contact with the surface for 10 min to be effective. However, it is recommended for planktonic cells; indeed there is no mention regarding the use in biofilm. Our results suggest that the commercial product needs a long-term exposure, at least 30 min, to cause reductions higher than 2.5 log CFU/cm<sup>2</sup> on *L. monocytogenes* biofilm. Probably the long time is required to allow the diffusion of this sanitizer through the EPS matrix, and consequently its action on the deeper layers of the biofilm (Kane, Getty & Mayer, 2016).

Dry heat (90°C) exhibited greater antimicrobial activity in the first 5 min on SS compared to PP. It could be related to the difference in the thermal conductivity of the materials, 52 W/mK for SS versus 0.17 W/mK for PP. In fact, SS heats faster than PP, accelerating the microbial thermal inactivation. There are no studies on the application of hot air on *L. monocytogenes* biofilm. However, research that evaluated other bacteria using different sources of dry heat showed greater thermal resistance. Dry heat (80°C) caused a reduction of 4 log CFU/cm<sup>2</sup> after 15 h on *Listeria innocua* M1 sessile cells on aluminum (Crandall et al., 2010). *Salmonella* adhered to SS had a reduction of 4.3 log CFU/cm<sup>2</sup> after 4 h in an oven at 90°C (McKelvey & Bodnaruk, 2011). Almatroudi et al. (2018) evaluated the effect of dry heat on *Staphylococcus aureus* biofilm formed on polycarbonate coupons. After 80°C/1h and 100°C/10min, the authors observed reductions of 0.12 and 0.88 log CFU/cm<sup>2</sup>, respectively. It is known that heat resistance is influenced by several factors, such as the natural strain resistance variation, the growing conditions and previous exposure to thermal shock or to other stresses (Doyle, Mazzota, Wang, Wiseman & Scott, 2001).

The ultraviolet light (UV-C) was more effective (p<0.05) to control the L. monocytogenes biofilm on PP than on SS. On PP, within 5 min, the sessile viable cells were decreased to below the limit of detection (<1.69 log CFU/cm<sup>2</sup>). Whereas, a reduction of 2.24 log CFU/cm<sup>2</sup> was obtained on SS only after 30 min. This result could be explained by the difference in the roughness and the topography of both materials. The presence of scratches on the SS coupons may have favored the phenomenon known as shadow effect, *i.e.*, bacterial cells are protected from the direct action of the radiation (Bintsis, Litopoulou-Tzanetaki & Robinson, 2000; Montgomery & Banerjee, 2015). In addition the UV-C can trigger a photodegradation process in polypropylene; chromophore groups absorb the radiation causing photo-oxidation. The phenomenon affects the polymer atoms bonds, decreasing the hardness and the elongation properties (Kowalski, 2009). According to Rutala et al. (2008) UV-C radiation is influenced by the presence of organic material, wavelength, temperature, microbial species and intensity of the light. Bae and Lee (2012) evaluated the effect of a much lower dose of UV (0.235 mW/cm<sup>2</sup>) on L. monocytogenes ATCC 7644 adhered cells. The authors observed reductions of 0.84 and 0.71 CFU/cm<sup>2</sup> after 30 min on SS and PP, respectively.

As observed for UV-C, the gaseous ozone exhibited different (p<0.05) performances between both surfaces, with reductions of 1.67 log CFU/cm<sup>2</sup> on SS and >3.75 log CFU/cm<sup>2</sup> on PP after 5 min. A greater reduction of *L. monocytogenes* on PP was also observed by Nicholas, Dunton, Tatham & Fielding (2013), with 45 ppm of gaseous ozone. The ozone acts on the double bonds of polymeric chains present in materials such as polypropylene, damaging the polymer surface, and consequently increasing the reactivity area (Megahed, Aldrige & Lowe, 2018). However, Marino et al. (2018) obtained counts of *L. monocytogenes* biofilm below the detection limit (<1 log CFU/cm<sup>2</sup>) on SS after exposure to ozone (20 ppm) for 60 min.

To date, there is no official methodology for evaluating dry sanitizers. Furthermore, no sanitizing performance criteria have been established by regulatory agencies for biofilm removal. According to AOAC (Method 960.09, 2013), a 5-log reduction of planktonic cells of *Escherichia coli* ATCC 11229 or *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 within 30 s is necessary for a wet sanitizer to be deemed effective. EN 1040 (2005), using *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* as target microorganisms, establishes the same reduction level but within 5 min of contact. Thus, according to the data obtained in this specific experimental condition, in order to achieve a 5-log reduction on SS an exposure time ranging from 49.6 min to 4220 h (Fig. 2a) would be necessary, *i.e.*, a variation of 5,000 times. On PP, it would occur between 6 and 122 min, which represents a difference of 20-fold between the least and the most effective treatment (Fig. 2b). Therefore, except UV-C and ozone on PP, none of the other treatments would be feasible if used alone for the control of the *L. monocytogenes* biofilm. Nevertheless, further studies involving different strains and combined methods are required to better understand the mechanisms involved in the resistance of this pathogen biofilm to dry sanitizers.

In conclusion, dry sanitizing methods must be carefully chosen, considering the type of surface material and the initial contamination level. Dry heat was the most effective treatment on SS for the control of *L monocytogenes* biofilm up to 15 min of exposure. On PP, UV-C and gaseous ozone exhibited the best performances, reaching reductions below the detection limit within 5 min.

## Acknowledgments

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for providing the financial support for scholarship.

## References

Almatroudi, A., Tahir, S., Hu, H., Chowdhury, D., Gosbell, I. B., Jensen, S. O., Whiteley, G. S., Deva, A. K., Glasbey, T., & Vickery, K. (2018). *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are more resistant to heat treatment than traditional hydrated biofilms. *Journal of Hospital Infection*, 98, 161–167. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.09.007.

AOAC Official Method 960.09. Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants. *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International, 2013.

Bae, Y. M., & Lee, S. Y. (2012). Inhibitory effects of UV treatment and a combination of UV and dry heat against pathogens on stainless steel and polypropylene surfaces. *Journal of Food Science*, 77(1), 61–64. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02476.x.

Beresford, M. R., Andrew, P. W., & Shama, G. (2001). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 1000–1005. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01330.x.

Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - A critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(6), 637–645. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1.

Boyce, J. M. (2018). Alcohols as surface disinfectants in healthcare settings. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 39(3), 323–328. https://doi.org/10.1017/ice.2017.301.

Brar, P. K., Proano, L. G., Friedrich, L. M., Harris, L. J., & Danyluk, M. D. (2015). Survival of *Salmonella, Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on raw peanut and pecan kernels stored at -24.4 and 22°C. *Journal of Food Protection*, 78(2), 323–332. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-327. Buckingham-Meyer, K., Goeres, D. M., & Hamilton, M. A. (2007). Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 236–244. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.010.

Carballo, J., & Araújo, A, B. (2012). Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonic cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. *Food Science and Technology*, 32(3), 606–612. https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000084.

Crandall, P. G., Shannon, E., Marcy, J., Ricke, S. C., O'Bryan, C. A., Martin, E. M., & Pendleton, S. (2010). Dry heat thermal inactivation of *Listeria innocua* on deli slicer components. *Food Protection*, 30(10), 588–592.

Codex Alimentarius Commission. (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. *CAC/GL* 61.

Codex Alimentarius Commision. (2015). Code of hygienic practice for lowmoisture foods. CXC 75-2015.

Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W., & Scott, V. N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64(3), 410–429. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.410.

EN 1040. (2005). Chemical Disinfectants and Antiseptics–Quantitative Suspension test for the evaluation of Basic Bactericidal activity of Chemical Disinfectants and Antiseptics–Test Method and Requirements (Phase 1). British Standard.

Epstein, A. K., Pokroy, B., Seminara, A., & Aizenberg, J. (2011). Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 995–1000. https://doi.org/10.1073/pnas.1011033108.

European Food Safety Authority. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*. 15 (12). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077.

Fagerlund, A., Heir, E., Møretrø, T., & Langsrud, S. (2020). *Listeria monocytogenes* Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents. *Molecules*, 25(792). https://doi.org/10.3390/molecules25040792.

Fernandes, M. da S., Kabuki, D. Y., & Kuaye, A. Y. (2015). 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*, 200, 97–103. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.004.

Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., & Van Impe, J. F. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. International *Journal of Food Microbiology*, 102(1), 95–105. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038.

Giaouris, E., Chorianopoulos, N., & Nychas, G. J. E. (2005). Effect of Temperature, pH, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella enterica enteritidis* PT4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements. *Journal of Food Protection*, 68 (10). https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2149.

Gurtler, J. B., Doyle, M. P., & Kornacki, J. L. (2014). The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices. New York: Springer.

ISO 11290–1: 2017. Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.

Kalmokoff, M. L., Austin, J. W., Wan, X. D., Sanders, G., Banerjee, S., & Farber, J. M. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal Of Applied Microbiology*, 91(4), 725-734. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01419.x.

Kane, D. M., Getty, K. J. K., & Mayer, B. (2016). Sanitizing in Dry-Processing Environments Using Isopropyl Alcohol Quaternary Ammonium Formula. *Journal of Food Protection*, 79(1), 112–116. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-257. Kimber, M. A., Kaur, H., Wang, L., Danyluk, M. D., & Harris, L. J. (2012). Survival of *Salmonella, Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on inoculated almonds and pistachios stored at -19, 4, and 24°C. *Journal of Food Protection*, 75(8), 1394–1403. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-023.

Koseki, S., Nakamura, N., & Shiina, T. (2015). Comparison of desiccation tolerance among *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica,* and *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Journal of Food Protection.* 78(1), 104-110. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-249.

Kowalski, W. (2009). Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook. New York: Springer.

Ly, V., Parreira, V. R., & Farber, J. M. (2019). Current understanding and perspectives on *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods. *Current Opinion in Food Science*, 26, 18–24. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.012.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguérinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1–2), 107–113. https://doi.org/ 10.1016/S0168-1605(01)00624-9.

Marino, M., Maifreni, M., Baggio, A., & Innocente, N. (2018). Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02024.

Marriott, N. G., Schilling, M. W., & Gravani, R. B. (2018). Principles of Food Sanitation (Sixth Edit). Springer.

Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., & López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 7:683. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00638.

McKelvey, P. J. & Bodnaruk, P. W. (2011) Survival of *Salmonella* species on stainless steel exposed to dry heat. IAFP Annual Meeting, Milwaukee, WI.

Megahed, A., Aldridge, B., & Lowe, J. (2018). The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. *Plos One*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196555.

Montgomery, N. L., & Banerjee, P. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in biofilms by pulsed ultraviolet light. *BMC Research Notes*, 1–12. https://doi.org/10.1186/s13104-015-1206-9.

Moore, G., Griffith, C., & Peters, A. (2000). Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1100–1106. https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.8.1100.

Nicholas, R., Dunton, P., Tatham, A., & Fielding, L. (2013). The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 555–564. https://doi.org/10.1111/jam.12239.

Reis-Teixeira, F. B. D., Alves, V. F., & Martinis, E. C. P. D. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 587-591. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004.

Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology*, 82, 533–540. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020.

Ronner, A. B., and Wong, A. C. L. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. *Journal of Food Protection*. 56, 750–758. doi: 10.4315/0362-028X-56.9.750.

Rutala, W. A., Weber, D. J., & HICPAC. (2019). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. CDC, 163.

Saá, P., Cabo, M. L., & Rodríguez, J. J. (2009). Effects of mussel processing soils on the adherence of *Listeria monocytogenes* to polypropylene and stainless steel. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1885–1890. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.9.1885.

Skowron, K., Hulisz, K., Gryń, G., Olszewska, H., Wiktorczyk, N., & Paluszak, Z. (2018). Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *International Microbiology*, 21(1–2), 23–33. https://doi.org/10.1007/s10123-018-0002-5.

Taylor, M. H., Tsai, H. C., Rasco, B., Tang, J., & Zhu, M. J. (2018). Stability ofListeria monocytogenes in wheat flour during extended storage and isothermaltreatment.FoodControl,91,434–439.https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.008.

Van Boekel, M. A. J. S., 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 74, 139–159. http://dx.doi. org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5.





**Fig 1.** Viable cell counts (CFU/cm<sup>2</sup>) on SS (A) and PP (B) after exposure to: dry heat, ( $\rightarrow$ ), ethanol ( $\rightarrow$ ), commercial product ( $\rightarrow$ ), UV-C radiation ( $\rightarrow$ ) and ozone ( $\rightarrow$ ). (---) Count below the limit of detection (<1.69 log CFU/cm<sup>2</sup>).



**Fig 2.** Time required for 5-log reductions  $(t_{5d})$  in ascending order and their n-fold increase relation on SS (A) and PP (B) surfaces.

# **CAPÍTULO 3**

# Effect of dry sanitizing methods on Bacillus cereus biofilm

Andréia Miho Morishita Harada, Maristela da Silva do Nascimento

# Abstract

**Aims:** In this study the efficacy of dry sanitizing treatments against *Bacillus cereus* biofilm formed on stainless steel (SS) and polypropylene (PP) was evaluated.

**Methods and Results:** The static method was used to form the biofilm. After 4 days at 25°C, the SS and PP coupons were exposed for up to 30 min to UV-C, dry heat, gaseous ozone, 70% ethanol and a commercial dry sanitizer. Sodium hypochlorite (200 mg l<sup>-1</sup>) was also tested (pH 7 and 11) for comparison purposes. From 10 min of exposure, 70% ethanol and the commercial product caused the lowest reductions on both surfaces. Dry heat exhibited a poor performance on PP, whereas on SS reductions up to 1.4 log CFU cm<sup>-2</sup> were observed. After 30 min, UV-C on SS and PP, and ozone on PP resulted in reductions around 2 log CFU cm<sup>-2</sup>. The same reduction level was obtained in 5 min with sodium hypochlorite.

**Conclusion:** For both surfaces, UV-C was the most promising dry sanitizing method. Nevertheless, none of the dry treatments was as effective as sodium hypochlorite on *B. cereus* biofilm.

**Significance and Impact of the Study:** The data can contribute to the food industry and regulatory agencies to develop or optimize dry hygiene protocols.

**Key-words:** *Bacillus cereus*, biofilm, dry sanitation, food hygiene, food contact surfaces

### 1. Introduction

In the food industry an effective cleaning and sanitizing program is crucial to prevent soil accumulation as well as microbial adhesion on surfaces (Peng et al. 2002). Low moisture foods (LMFs) are defined as foods that have a water activity ≤0.85 (Codex, 2015). Hygiene control in LMF manufacturing plants deserves constant attention to avoid the increase of moisture. Pathogens usually associated with LMFs are *Salmonella* and *Bacillus cereus* (Codex, 2015). *B. cereus* can easily spread and contaminate food production environments (Simões et al. 2010). Moreover, it can induce gastrointestinal diseases (emetic or diarrheal syndromes) (Pagedar and Singh, 2012).

Extracellular lipases and proteases produced by *B. cereus* are associated with food spoilage, resulting in economic losses (Majed et al. 2016). Furthermore, this microorganism has a great capability to form biofilm on many food contact surfaces such as stainless steel, rubber, glass, gaskets and conveyor belts (Faille et al. 2014; Hussain and Oh, 2017; Kwon et al. 2017).

*B. cereus* has been isolated from dairy and bakery products, rice, infant foods, spices, ready to eat foods, cocoa and chocolate, cereals and vegetables (Pagedar and Singh, 2012; Tewari and Abdullah, 2015). Outbreaks due to the consumption of cereals, rice, herbs and spices have already been reported (EFSA, 2009; CDC, 2012; Gurtler et al. 2014).

Based on this scenario, dry sanitizing is a key step to guarantee food safety. Alcohols are commonly used as surface sanitizers. Their main advantages are quick evaporation, no residues and penetration effect (Thomas, 2012). Reductions of approximately 1.0 log CFU cm<sup>-2</sup> on biofilm of *B. cereus* were observed on stainless steel (SS) and polypropylene (PP) coupons exposed to ethanol (70% v/v) (Kim et al. 2019). Dry heat, UV-C radiation and gaseous ozone as well as alcohols are dry methods that do not produce toxic residues. *B. cereus* adhered cells on SS reached a reduction of 2.1 log CFU ml<sup>-1</sup> after being exposed to UV-C radiation (Ha and Ha, 2010).

Most of the studies found are focused on sanitization effects on *B. cereus* spores, considering their higher resistance. However, it is also essential to understand the resistance of vegetative cells, especially in biofilm, and, to the best of our knowledge, there is no data in the literature on the comparison of different dry

sanitizing methods against *B. cereus* biofilm. Therefore, this study aimed to evaluate the efficacy of gaseous ozone, dry heat, UV-C, 70% ethanol and a commercial sanitizer based on quaternary ammonium and isopropyl alcohol (IPA) on *B. cereus* biofilm formed on SS and PP coupons. For comparison purposes, sodium hypochlorite (200 mg l<sup>-1</sup>), the most common sanitizing agent used in the food industry, was also tested.

# 2. Experimental Procedures

# 2.1. Bacterial strains

Three strains of *B. cereus* ATCC14579, NCTC11143 (emetic type) and NCTC11145 (diarrheal type) isolated from a farm, human vomit and a meat loaf, respectively, were used in this study to compose a pool. Stock cultures were stored at  $-80^{\circ}$ C in trypticase soy broth (TSB, Difco, MD, USA) with 15% (v/v) glycerol. Each strain was cultured twice in TSB (Difco) for 24 h at 37°C, followed by streaking on Trypticase Soy Agar (TSA, Difco) and incubated in the same condition. Isolated colonies were picked and diluted in a 0.85% saline solution (equivalent to 1.0 McFarland). Then, the inoculum was prepared from a pool containing equal volume of each strain diluted in TSB up to the final concentration of *ca.* 7 log CFU ml<sup>-1</sup>.

# 2.2. Biofilm formation

The experiment was performed on stainless steel (SS) AISI 304 and polypropylene (PP) coupons (1 cm<sup>-2</sup>). All surfaces were previously prepared according to Fernandes et al. (2015). The procedures included washing with neutral detergent, rinsing in distilled water, immersing in 70% (v/v) ethanol for 1 h, rinsing, and drying at room temperature. After that, SS coupons were sterilized for 15 min at 121°C, and PP coupons were exposed to ultraviolet light in a laminar flow cabinet for 30 min each side. Then, TSA plates covered with filter paper (Whatman Qualitative Grade 2, UK) were inoculated with 1.5 ml of the *B. cereus* pool and gently swirled. After that the coupons were placed on the center of the plates (adapted from Charaf et al. 1999 and Oja et al. 2014). The plates

were sealed with parafilm to avoid desiccation and incubated for 4 days. LMF processing and packaging environments are usually maintained at room temperature (Codex, 2015), thus the incubation was held at 25°C.

# 2.3. Sanitizing Procedures

After the incubation period, two coupons of each material (SS and PP) were removed from the plates and immersed in 0.85% saline solution for 1 min to remove the planktonic cells. Then, they were maintained in a laminar flow cabinet for 10 min to dry. After this period, the coupons were exposed to the dry sanitizing methods for 5, 10, 15 and 30 min. Coupons with *B. cereus* biofilm but non-submitted to any sanitizing treatment were considered for time zero (0 min). Previous tests showed that there was no significant difference (P>0.05) between sessile cell counts on two coupons of the same surface material (data not shown). All the trials were performed three times.

#### 2.3.1. Sodium Hypochlorite

Two different sodium hypochlorite solutions (200 mg l<sup>-1</sup>) were tested: without pH correction (pH 11) and with pH correction (pH 7), adjusted with hydrochloric acid (Merck, Germany) 0,1N. The solutions were previously titred according to the Brazilian National Standards Organization methodology (ABNT NBR 9425) (ABNT, 2005). After each exposure time, the coupons were neutralized through immersion in 5 mL of 0.85% saline solution supplemented with 1% sodium thiosulfate (Synth, Brazil) for at least 5 min (adapted from EN 1040:2005; Fernandes et al. 2015).

#### 2.3.2. Ozone

The SS and PP coupons were placed inside a sterile petri dish and exposed to the gaseous ozone inside a hermetic acrylic box (37 x 27 x 25 cm). The gas was generated using the Ozoxi generator (Ozoxi, Brazil). The concentrations inside the box were measured with an ozone analyzer (UV-100, EcoSensors, USA) and maintained at 45  $\pm$  2 mg l<sup>-1</sup> (adapted from Nicholas et al. 2013). Temperature and relative humidity (RU) were measured
with AM2302/DHT22 sensor (Aosong, China) and maintained at approximately 25°C/50% RU.

### 2.3.3. Dry heat

The SS and PP coupons were placed inside a sterile petri dish in the center of a glass box (30 x 15 x 19 cm). Then, they were exposed to continuous perpendicular hot air flow of approximately 2.0 m s<sup>-1</sup> applied with a heat blower (Taiff, Brazil). A membrane filter (Millipore, S- Pack, Merck, Germany) was used to cover the air outlet. The temperature was monitored by a thermocouple (PT100, testo 112, Germany) and maintained at 90  $\pm$  2°C (Andrade, 2008).

#### 2.3.4. UV-C radiation

The SS and PP coupons were exposed to UV-C radiation inside an opaque black box (30 x 15 x 15 cm). They were placed inside a sterile petri dish in the center of the box, 15 cm under a 8W UV-C lamp (OSRAM, GmbH, Italy). A radiometer (Maestro, Gentec, Canada) monitored the delivered UV-C dose rate, approximately 6.5 mW cm<sup>-2</sup> (adapted from Sommers et al. 2010).

## 2.3.5. Ethanol 70%

The 70% (v/v) ethanol solution was dispensed on the SS and PP coupons until covering the entire surface (*ca.* 45  $\mu$ l<sup>-1</sup>). After each exposure time, the coupons were neutralized by immersion in 5 ml of Letheen Broth (LB, Acumedia, MI, USA) supplemented with Tween 80 (Sigma Aldrich, Germany), for the same period of time as the treatments (adapted from Rutala et al. 2008 and Chojecka et al. 2017).

### 2.3.6. Commercial dry disinfectant

The composition of the commercial product consisted of dodecyl dimethyl ammonium chloride (0.015%), sequester, isopropyl alcohol (25%) and water. The same protocol described for ethanol 70% was used.

## 2.4. Enumeration of viable sessile cells

After each treatment and tested time, the SS and PP coupons were immersed in 5 ml of 0.85% saline solution and vortexed with glass beads for 1 min to remove sessile cells (adapted from Giaouris et al. 2005). Neutralized coupons, exposed to 70% ethanol, commercial product and sodium hypochlorite solutions, were subjected to this step in the same tube containing the neutralizing solution with glass beads. Decimal dilutions were prepared in peptone water 0.1% and spread plated on TSA followed by incubation at 37°C for 24 h. Typical colonies were confirmed by growing in selective media Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP, Acumedia, MI, USA) and haemolysis test (ISO 7932:2004). The results were expressed as log CFU cm<sup>-2</sup> and the limit of detection was 1.69 CFU cm<sup>-2</sup>.

## 2.5. Statistical analysis

The reduction rate (log N/N<sub>0</sub>) of the *B. cereus* biofilm was analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test to determine whether there were significant differences (P<0.05) among the treatments, surfaces and exposure times using SAS software (version 9.4, SAS Institute, Cary, NC).

# 3. Results

After 4 days at 25°C, sessile cell counts of the *B. cereus* 3-strain pool were 5.4 and 6.1 log CFU cm<sup>-2</sup> on SS and PP coupons, respectively. The incubation time needed for biofilm formation was established in preliminary trials (data not shown).

The effectiveness of seven sanitizing protocols against *B. cereus* biofilm formed on SS and PP coupons was evaluated during five different exposure times (Figure 1). There was no significant difference (P>0.05) among the dry treatments in the first 15 min of exposure. However, after 30 min, on SS the performance of UV-C was greater (P<0.05) than ethanol and the commercial product. In addition, on PP, UV-C and ozone differed (P<0.05) from the other dry treatments.

In general, ethanol exhibited the lowest reductions of *B. cereus* biofilm (<0.5 log CFU cm<sup>-2</sup>) on both surfaces (Fig. 1a). The commercial product, based on IPA and quaternary ammonium compound, had a similar result of ethanol on PP, with a maximum reduction of 0.62 log CFU cm<sup>-2</sup>. On SS, the greatest reduction was observed after 5 min of treatment, 1.08 log CFU cm<sup>-2</sup> (Fig. 1b). Exposure to dry heat (90°C) resulted in reductions ranging from 0.53 to 1.43 log CFU cm<sup>-2</sup> on SS whereas oscillations in the biofilm load throughout the time were observed on PP (Fig. 1c). The effect of UV-C light against *B. cereus* biofilm on SS exhibited a linear trend. On the other hand, on PP, as reported for dry heat, an oscillation in the biofilm counts was observed. However, on both surfaces, the maximum reduction occurred after 30 min, *ca.* 2 log CFU cm<sup>-2</sup> (Figure 1d). Unlike UV-C, gaseous ozone showed greater action on SS in the first 10 min, followed by a stable phase. On PP there was an increase in the reduction throughout the exposure time, until reaching 2.16 log CFU cm<sup>-2</sup> after 30 min.

Sodium hypochlorite solutions (200 mg l<sup>-1</sup>) with and without pH correction caused the greatest reductions on the *B. cereus* biofilm. Both solutions showed a similar behavior trend (P>0.05), with a sharp decline in the first 5 min, followed by a deceleration phase (Figures 1f and 1g). Sodium hypochlorite without pH correction (pH 11) resulted in reductions of up to 2.64 on SS and 2.92 log CFU cm<sup>-2</sup> on PP. The solution with pH 7 reduced the biofilm population to below the limit of detection (<1.69 log CFU cm<sup>-2</sup>) after 10 and 15 min, on SS and PP, respectively.

## 4. Discussion

The presence of *B. cereus* in the food industry is a factor of great concern, since it is a pathogenic and spoilage microorganism, plus it can be easily dispersed in the manufacturing environment. This is the first study that has assessed *B. cereus* biofilm formation under nutrient limitations as well as the action of different dry sanitizing methods on this bacterium. Moreover, the performance of the dry methods was compared to sodium hypochlorite solution, a sanitizer widely used in the food industry.

Sites of low moisture can be found in both high and low water activity ( $a_w$ ) food processing plants. Based on that, a static method (Charaf et al. 1999; Oja et al. 2014), which does not expose coupons directly to a liquid medium, was chosen to perform the biofilm formation. However, in order to simulate restrictions of nutrients and moisture, the rehydration step described in the original method was not carried out in the current study. There are no previous studies that used the static method to evaluate *B. cereus* biofilm formation.

The sessile cell concentration achieved on both surfaces (5 log CFU cm<sup>-2</sup>) was established by Ronner and Wong (1993) as a threshold for biofilm formation regardless of the methodology used. *B. cereus* sessile cell counts ranging from 5 to 6.5 log CFU cm<sup>-2</sup> were reported by other studies that used immersion in liquid medium as a biofilm formation method (Ryu and Beuchat, 2005a; Fernandes et al. 2014; Kim et al. 2019.

To optimize a hygiene program, several factors must be considered, including the treatment exposure time and the type of surface material. In our study, the exposure time had a significant influence (P<0.05) on the efficiency of most sanitizing treatments on *B. cereus* biofilm on SS, the exception being the ethanol solution. On PP, the exposure time influenced (P<0.05) the performance of three out of the seven treatments (UV-C, ozone, chlorine pH 11). Nevertheless, there was no significant difference (P>0.05) between both surface materials when evaluated at the same exposure time and treatment.

The weak antimicrobial action of ethanol (70% v/v) on SS and PP observed in this study corroborate findings of Kim et al. (2019), who obtained a reduction <1 log CFU cm<sup>-2</sup>. The presence of extracellular polymeric substances

(organic matter) common in biofilms could have limited the ethanol action (Rutala et al. 2008).

According to Cronin and Wilkinson (2008), IPA (70%) was able to damage the cell membrane of *B. cereus* NCTC 7464. The commercial product tested in our study is an association of IPA (25%) and chloride of didecil dimethyl ammonium (0.015%). The highest reductions observed were 1.08 log CFU cm<sup>-2</sup> after 5 min on SS and 0.62 log CFU cm<sup>-2</sup> after 15 min on PP. There were no data on the action of this kind of product against *B. cereus* biofilm. Nonetheless, it has been reported that *B. subtilis* biofilm is strongly liquid repellent, resistant even to ethanol 80% (Epstein et al. 2011). A similar behavior of *B. cereus* biofilm could explain the low effectiveness of the alcohol based sanitizers.

The results showed that the dry heat (90°C) effectiveness was slightly higher on SS than on PP, but without statistical difference (P>0.05). The maximum reductions were observed after 15 min, 1.43 log CFU cm<sup>-2</sup> on SS and 0.87 log CFU cm<sup>-2</sup> on PP. There are no data on the use of dry heat against *B. cereus* biofilm. A forced ventilation system was tested on *Staphylococcus aureus* biofilm on polycarbonate. After 60 min at 80°C and 10 min at 100°C reductions of 0.12 and 0.88 log were observed (Almatroudi et al. 2018).

Among all dry methods tested, UV-C light exhibited the best performance on SS. On both surfaces, reductions of *ca.* 2 log CFU cm<sup>-2</sup> were observed after 30 min. A similar value has been reported for *B. cereus* F4810/72 sessile cells on SS (Ha and Ha, 2010). Bae and Lee (2012) evaluated the effect of UV-C (0.235 mW cm<sup>-2</sup>) on the inactivation of *Listeria monocytogenes* adhered cells. After 30 min, the authors observed reductions of 0.84 and 0.71 log CFU cm<sup>-2</sup> on SS and PP, respectively. One of the factors that influences the performance of UV-C (254 nm) is the presence of extracellular polymeric substance. It provides a protective effect to the microorganism, since UV-C has low penetrating power (Bernbom et al. 2011; Kuda et al. 2012; Shikano et al. 2017). Moreover, the stationary phase is more resistant to radiation (Bucheli-Witschel et al. 2010). Gayán et al. (2013) evaluated the effect of UV-C (8W) on *B. cereus* spore suspension and reported a reduction of 2.93 log CFU ml<sup>-1</sup>.

In 2001, the Food and Drug Administration (FDA) approved the use of ozone as an antimicrobial agent for food treatment, which can be used in aqueous and gaseous phases (FDA, 2001). Initially, ozone had a greater antimicrobial action

on SS than on PP. However, after 30 min a reduction of 1.32 log CFU cm<sup>-2</sup> was observed on SS versus 2.16 log CFU cm<sup>-2</sup> on PP. The better performance verified on PP after a longer exposure period could be related to the gas ability to degrade and damage the polymer surface, which results in an increase of the reactivity area (Megahed et al. 2018). The same ozone concentration (45 mg l<sup>-1</sup>) was used by Nicholas et al. (2013) on *L. monocytogenes* biofilm. After 60 min, reductions of 0.56 and 0.90 log CFU cm<sup>-2</sup> were obtained on SS and PP, respectively. Another study evaluated the effect of a lower concentration of ozone (25 mg l<sup>-1</sup>) on planktonic cells of *B. cereus* ATCC 11778. The authors reported a reduction >3.1 log CFU ml<sup>-1</sup> after 20 min (Sharma and Hudson, 2008).

The chlorine bactericidal activity is attributed to the undissociated hypochlorous acid. This acid predominates in solutions with pH <7.5 (Fukuzaki et al. 2007; Rutala et al. 2008). Considering these characteristics, two sodium hypochlorite solutions (200 mg l<sup>-1</sup>) were tested: one without pH correction (pH 11) and the other with pH correction (pH 7). Sodium hypochlorite pH 7 reached reductions up to 1.4 and 1.7 log CFU cm<sup>-2</sup> greater than sodium hypochlorite pH 11 on SS and PP, respectively. However, this difference was not statistically significant (P>0.05).

The inactivation curve tendency observed for both solutions in the current study was also reported by Ryu and Beuchat (2005b) on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm. Kim et al. (2019) using the same concentration after 10 min obtained reductions lower than those observed in our study, 1.34 and 1.47 log CFU cm<sup>-2</sup> on SS and PP, respectively.

According to the Association of Official Analytical Chemists - Method 960.09 (AOAC, 2013) a 5 log reduction within 30 s of exposure is necessary for a sanitizer to be considered effective. The highest reduction (3.55 log CFU cm<sup>-2</sup>) within the shortest period of time tested (5 min) was obtained with sodium hypochlorite (pH 7). None of the tested protocols would be able to achieve the AOAC recommendations. However, it is important to note that the study was carried out with biofilm and not planktonic cells as recommended by the AOAC method.

In comparison to sodium hypochlorite (200 mg l<sup>-1</sup>), all dry sanitizing methods had low effectiveness against *B. cereus* biofilm on both surface materials tested (P<0.05), with reductions <1.5 log CFU cm<sup>-2</sup> up to 15 min of exposure.

Thereby, the results indicate that in the specific experimental condition evaluated in this study, dry sanitizing methods require a long period of exposure to reach high reductions, which does not always suit a food manufacturing routine. Thus, further studies to assess the effectiveness of the combination of different dry sanitizing methods with each other or with dry cleaning methods are needed.

# Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for providing the financial support for scholarship (CNPq – Process 132828/2018-9).

# **Conflict of Interest**

No conflict of interest declared.

# References

Almatroudi, A., Tahir, S., Hu, H., Chowdhury, D., Gosbell, I.B., Jensen, S.O., Whiteley, G.S., Deva, A.K., Glasbey, T. and Vickery, K. (2018) *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are more resistant to heat treatment than traditional hydrated biofilms. *J Hosp Infect* **98**, 161-167.

Andrade, N.J.D. (2008) Higienizacao na industria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela

AOAC International (2013). Official Method 960.06 Germicidal and detergent sanitizing action of disinfectants. AOAC Official Methods of Analysis. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005) 21st Ed., American Public Health Association, Washington, DC, USA.

Bae, Y.M. and Lee, S.Y. (2012) Inhibitory effects of UV treatment and a combination of UV and dry heat against pathogens on stainless steel and polypropylene surfaces. *J Food Sci*, **77**, 61-64.

Bernbom, N., Vogel, B.F. and Gram, L. (2011) *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. *Int J Food Microbiol* **147**, 69-73.

Brazilian National Standards Organization. ABNT NBR 9425 (2005) Sodium hypochlorite - Determination of active chlorine - Volumetric method. ABNT, Rio de Janeiro.

British Standard - BS EN 1040 (2005) Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1). British Standards Institution.

Bucheli-Witschel, M., Bassin, C. and Egli, T. (2010) UV-C inactivation in *Escherichia coli* is affected by growth conditions preceding irradiation, in particular by the specific growth rate. *J Appl Microbiol* **109**, 1733-1744.

Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne outbreak online database. Available at http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/. Accessed on 2 August 2018. Charaf, U.K., Bakich, S.L. and Falbo, D.M. (1999) A model biofilm for efficacy assessment of antimicrobials versus biofilm bacteria. In Biofilms: The Good, The Bad and The Ugly ed. Wimpenny, J., Gilbert, P., Walker, J., Brading, M. and Bayston, R. pp. 171–178. Cardiff, UK: BioLine.

Chojecka, A., Tarka, P., Kierzkowska, A., Nitsch-Osuch, A. and Kanecki, K. (2017) Neutralization efficiency of alcohol based products used for rapid hand disinfection. Rocz Panstw Zakl Hig **68**. 389-394.

Codex (2015) Code of Hygienic Practice for Low-Moisture Foods. CAC/RCP 75-2015.

Cronin, U.P. and Wilkinson, M.G. (2008) Physiological response of *Bacillus cereus* vegetative cells to simulated food processing treatments. *J Food Protect* **71**, 2168-2176.

Epstein, A.K., Pokroy, B., Seminara, A. and Aizenberg, J. (2011) Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *P Natl Acad Sci USA* **108**, 995-1000.

European Food Safety Authority. (2009) The community summary report on foodborne outbreaks in the European Union in 2007. *EFSA Journal* **7**, 271r.

European Standard EN ISO 7932 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30°C (ISO 7932:2004).

Faille, C., Bénézech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., Ronse, A. and Slomianny, C. (2014) Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol* **40**, 64-74.

Fernandes, M. da S., Fujimoto, G., Schneid, I., Kabuki, D.Y., and Kuaye, A.Y. (2014) Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. *Int Dairy J* **38**, 16-23. Fernandes, M. da S., Kabuki, D.Y. and Kuaye, A.Y. (2015) Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. *Int J Food Microbiol* **200**, 97-103.

Food and Drug Administration (2001). Guidance and regulation: Food Code. U.S. Department of Health and Human Services.

Fukuzaki, S., Urano, H. and Yamada, S. (2007) Effect of pH on the efficacy of sodium hypochlorite solution as cleaning and bactericidal agents. *J Surface Finish Soc Jpn* **58**, 465-465.

Gayán, E., Álvarez, I. and Condón, S. (2013) Inactivation of bacterial spores by UV-C light. *Innov Food Sci Emerg* **19**, 140-145.

Giaouris, E., Chorianopoulos, N. and Nychas, G.J.E. (2005) Effect of Temperature, pH, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella enterica enteritidis* PT4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements. *J Food Protect* **68**, 2149-2154.

Gurtler, J. B., Doyle, M. P. and Kornacki, J. L. (2014). *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. New York: Springer.

Ha, J.I.H. and Ha, S.D. (2010) Synergistic effects of ethanol and UV radiation to reduce levels of selected foodborne pathogenic bacteria. *J Food Protect* **73**, 556-561.

Hussain, M. S., and Oh, D. H. (2017) Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: Effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. *Food Control* **77**, 270-280.

Kim, H., Moon, M.J., Kim, C.Y. and Ryu, K. (2019) Efficacy of chemical sanitizers against *Bacillus cereus* on food contact surfaces with scratch and biofilm. *Food Sci Biotechnol* **28**, 581-590.

Kuda, T., Iwase, T., Chaturongkasumrit, Y., Takahashi, H., Koyanagi, T. and Kimura, B. (2012) Resistances to UV-C irradiation of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in wet and dried suspensions on surface with egg residues. *Food Control* **23**, 485-490.

Kwon, M., Hussain, M. S., and Oh, D. H. (2017) Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. *Food Sci Biotechnol*, **26** 1103-1111.

Majed, R., Faille, C., Kallassy, M. and Gohar, M. (2016) *Bacillus cereus* biofilms -Same, only different. *Front Microbiol* **7**, 1-16.

Megahed, A., Aldridge, B. and Lowe, J. (2018) The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. *Plos One* **13**, e0196555

Nicholas, R., Dunton, P., Tatham, A., and Fielding, L. (2013) The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*, **115**, 555-564.

Oja, T., Blomqvist, B., Buckingham-Meyer, K., Goeres, D., Vuorela, P. and Fallarero, A. (2014) Revisiting an agar-based plate method: What the static biofilm method can offer for biofilm research. *J Microbiol Meth* **107**, 157-160.

Pagedar, A., and Singh, J. (2012) Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. *Int Dairy J* **23**, 30-35.

Peng, J. S., Tsai, W. C., and Chou, C. C. (2002) Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int J Food Microbiol* **77**, 11-18.

Ronner, A.B. and Wong, A.C.L. (1993) Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. *J Food Protect* **56**, 750-758.

Rutala, W. A., Weber, D. J. and Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008). *Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities*, Centers for Disease Control and Prevention. Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. (2005a) Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid–based sanitizer. *J Food Protect* **68**, 2614-2622.

Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. (2005b) Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Appl Environ Microb*, **71**, 247-254.

Sharma, M. and Hudson, J. B. (2008) Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am J Infect Control* **36**, 559-563.

Shikano, A., Kuda, T., Takahashi, H. and Kimura, B. (2017) Effect of quantity of food residues on resistance to desiccation, disinfectants, and UV-C irradiation of spoilage yeasts adhered to a stainless steel surface. *LWT* **80**, 169-177.

Simões, M., Simões, L.C., and Vieira, M.J. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT* **43**, 573-583.

Sommers, C.H., Sites, J.E. and Musgrove, M. (2010) Ultraviolet light (254 nm) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. *J Food Safety*, **30**, 470-479.

Tewari, A., and Abdullah, S. (2015) *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *J Food Sci Tech*, **52**, 2500-2511.

Thomas, P. (2012) Long-term survival of *Bacillus* spores in alcohol and identification of 90% ethanol as relatively more spori/bactericidal. *Curr Microbiol* **64**, 130-139.



**Figure 1.** Effect of different sanitizing protocols against *Bacillus cereus* biofilm formed on stainless steel (----) and polypropylene (----) coupons. (a) 70% ethanol, (b) commercial product, (c) dry heat, (d) UV-C, (e) gaseous ozone (f) sodium hypochlorite (200 mg l-1) pH 7, (g) sodium hypochlorite (200 mg l-1) pH 11. (---) Count below the limit of detection (<1.69 log CFU cm-2). N0, initial population. N, population after treatment. CFU, colony forming unity. Bars represent standard deviation. All the experiments were performed three times.

# DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo é o primeiro trabalho a avaliar a eficiência de diferentes protocolos de sanitização a seco sobre biofilmes de *L. monocytogenes* e *B. cereus* formados em superfícies de aço inoxidável (AI) e polipropileno (PP). Ambas as bactérias testadas, após os respectivos períodos de incubação a 25°C, apresentaram contagens superiores a 5 log UFC/cm<sup>2</sup>, valor mínimo para se caracterizar a formação de biofilmes, conforme descrito por Rooner e Wong (1993).

Pode-se observar que o desempenho dos métodos de sanitização a seco testados em biofilme de *L. monocytogenes* foi influenciado (p<0,05) pelo tempo de exposição, exceto a aplicação de ar quente e álcool etílico 70% em Al. Em relação ao biofilme de *B. cereus* formado em Al, o tempo de exposição também influenciou (p<0,05) a maioria dos tratamentos, exceto a solução de álcool etílico 70%. Já em PP, houve influência do tempo nos tratamentos com luz UV-C, ozônio e solução de hipoclorito de sódio (pH 11).

A aplicação de calor úmido, apesar de ser mais eficiente que o calor seco (ALMATROUDI et al., 2018), resulta na introdução de água/umidade no ambiente fabril, o que não é desejável para alimentos de baixa a<sub>w</sub>. A exposição do biofilme de *L. monocytogenes* ao ar quente se mostrou mais efetiva nos primeiros 5 min de tratamento em AI (2,39 log UFC/cm<sup>2</sup>) quando comparada ao PP (1,53 log UFC/cm<sup>2</sup>). Em biofilme de *B. cereus,* também foi constatada uma maior eficiência em AI, porém, neste caso sem diferença significativa (p>0,05). A maior eficiência frente a aplicação do ar quente em superfície de AI pode ser justificada devido a maior condutividade térmica do material, o que faz com que acelere a inativação térmica.

Não foram encontrados estudos de aplicação deste método em biofilmes de ambas as bactérias. Crandall et al. (2010) obtiveram redução de 4 log UFC/cm<sup>2</sup> em células aderidas de *Listeria innocua* M1 em alumínio após 15h a 80°C. Estudos de Almatroudi et al. (2018) com exposição de biofilme de *Staphylococcus aureus* a 80°C/60min e 100°C/10 min resultaram em reduções de 0,12 e 0,88 log/cupom, respectivamente.

A aplicação da solução de álcool etílico 70% (v/v) apresentou fraco desempenho, tanto em Al quanto em PP, frente a ambas as bactérias. Não

houve diferença significativa (p>0,05) quanto as reduções ao longo do tempo, exceto a exposição do biofilme de *L. monocytogenes* em PP, onde após 30 min foi observada redução de 2,38 log UFC/cm<sup>2</sup>. Uma maior redução foi observada por Fagerlund et al. (2020) onde a ação do etanol 75% por 15 min sobre biofilme de *L. monocytogenes* em superfície de PVC, acarretou a redução de aproximadamente 3 ciclos logaritmicos. Reduções observadas em biofilme de *B. cereus,* em ambas as superfícies, se mantiveram abaixo de 1 log UFC/cm<sup>2</sup>, resultados que corroboram os estudos de Kim et al. (2019). Deve-se levar em consideração que a presença de matéria orgânica afeta diretamente a eficiência de agentes sanitizantes como o álcool etílico, uma vez que sua interação reduz a disponibilidade do composto ativo, além de agir como uma barreira física, limitando a ação do mesmo (BOYCE, 2018; RUTALA et al., 2008).

Os resultados observados devido a exposição ao produto comercial (denominado desinfetante a seco), à base de composto quaternário de amônia (0,015%) e álcool isopropílico (25%), sugerem um extenso tempo de exposição, de no mínimo 30 min a fim de se obter reduções maiores que 2,5 log UFC/cm<sup>2</sup> em biofilme de *L. monocytogenes*. Este fato pode estar relacionado ao tempo de difusão do composto pela matriz de EPS do biofilme (KANE, GETTY e MAYER, 2016). As maiores reduções observadas em biofilme de *B. cereus* ocorreram após 5 min em AI (1,08 log UFC/cm<sup>2</sup>) e 15 min em PP (0,62 log UFC/cm<sup>2</sup>). Estudos realizados por Epstein et al. (2011) descrevem uma forte repulsão por líquidos observada em biofilme de *Bacillus subtilis*, resistindo até mesmo a soluções de álcool etílico 80%, característica que pode também estar associada ao biofilme de *B. cereus*.

O material da superfície teve influência no desempenho da luz UV-C e do ozônio gasoso em biofilme de *L. monocytogenes*. A contagem de células viáveis foi reduzida abaixo do limite de detecção (<1,69 log UFC/cm<sup>2</sup>) após o menor tempo avaliado (5 min) em ambos os tratamentos em PP. Após 30 min de exposição a luz UV-C, foi observada redução de aproximadamente 2 log UFC/cm<sup>2</sup> em biofilme de *L. monocytogenes* em AI, valor similar as reduções de *B. cereus* em ambas as superfícies. A aplicação deste método apresentou-se como o método a seco mais eficaz em biofilme de *B. cereus* formados em AI.

Ranhuras nos cupons de AI, que eram reutilizados durante os experimentos, são potenciais locais de deposição de bactérias, onde o efeito

sombra é capaz de proteger as células localizadas nas partes mais profundas (BINTSIS et al., 2000; MONTGOMERY & BANERJEE, 2015). A sensibilidade da superficie de PP, sujeita a foto-oxidação devido a ação da radiação UV-C, também pode ter influenciado os resultados obtidos (KOWALSKI, 2009).

O interesse pelo uso do ozônio na indústria de alimentos é crescente (MARINO et al., 2018). Assim como a luz UV-C, o ozônio gasoso foi capaz de reduzir as contagens de *L. monocytogenes* abaixo do limite de detecção em PP. Além disso, o melhor desempenho em biofilme de *B. cereus* dentre os métodos a seco nesta superfície, foi atribuído a ação do ozônio, resultando em redução de 2,16 log UFC/cm<sup>2</sup> após 30 min. Em AI, foram obtidas reduções de 1,32 e 3,37 log UFC/cm<sup>2</sup> em biofilmes de *B. cereus* e *L. monocytogenes,* respectivamente, após o maior tempo de exposição testado. A mesma concentração de ozônio gasoso (45 ppm) avaliada por Nicholas et al. (2013), também resultou em maior redução em PP. A ação do gás nas ligações das cadeias poliméricas tem capacidade de danificar a superfície do polímero, aumentando assim a área de reatividade (MEGAHED, ALDRIDGE & LOWE, 2018).

Soluções de hipoclorito de sódio (200 mg/L), com e sem correção de pH, também foram testadas em biofilme de *B. cereus*. A solução com pH corrigido (pH 7), apresentou melhor desempenho, em comparação à solução sem correção (pH 11), porém, sem diferença estatística (p>0,05). Uma vez que a correção de pH favorece a formação do ácido hipocloroso, forma responsável pela ação bactericida, pode-se constatar a importância do ajuste de pH a fim de se garantir a eficiência de sua aplicação. Curvas de inativação semelhantes foram observadas por Ryu e Beuchat (2005) em biofilme de *Escherichia coli* O157:H7.

Não foram encontradas metodologias oficiais para a avaliação de sanitizantes secos, nem para biofilmes. A AOAC (Método 960.09, 2013) estabelece como critério de validação para sanitizantes úmidos a obtenção de redução de 5 log de células plânctonicas do micro-organismo alvo após 30s de tratamento. Extrapolando o parâmetro para as condições do estudo atual, verifica-se que para ambos os patógenos avaliados, longos períodos de exposição seriam necessários a fim de se atingir reduções de 5 ciclos logarítmicos na maioria dos tratamentos a seco testados.

De um modo geral, pode-se observar maior resistência por parte do biofilme formado por *B. cereus* quando comparado a *L. monocytogenes*. Este fato pode estar relacionado a diferente dinâmica de formação dos biofilmes de cada uma das espécies ou cepas utilizadas, assim como a possível formação de esporos de *B. cereus*.

# **CONCLUSÕES GERAIS**

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a luz UV-C e o ozônio gasoso apresentam grande potencial no controle de *L. monocytogenes* em PP. Ambos os métodos foram capazes de reduzir as contagens abaixo do limite de detecção (1,69 log UFC/cm<sup>2</sup>) em apenas 5 min. Já em AI, após 15 min as maiores reduções foram observadas para os tratamentos de ar quente e ozônio gasoso.

A exposição ao ozônio gasoso e a luz UV-C também foram os métodos a seco mais eficazes no controle de biofilme de *B. cereus,* considerando ambos os materiais testados. Contudo, a solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L) mostrou melhor desempenho quando comparada aos tratamentos a seco, os quais promoveram reduções inferiores a 2,1 log UFC/cm<sup>2</sup>.

De modo geral, os protocolos de sanitização a seco avaliados no presente estudo demonstraram baixa eficiência em relação ao controle de biofilme de *L. monocytogenes* e *B. cereus*, não sendo indicados para uso isolado na higienização de ambientes fabris. Uma vez que, longos períodos de exposição seriam necessários para se obter reduções significativas (5 log UFC/cm<sup>2</sup>) de ambos os biofilmes.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMATROUDI, A. et al. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are more resistant to heat treatment than traditional hydrated biofilms. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, n. 2, p. 161-167, 2018.

AOAC Official Method 960.09. Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, 2013.

BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - A critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 6, p. 637-645, 2000.

BOYCE, J. M. Alcohols as surface disinfectants in healthcare settings. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 3, p. 323-328, 2018.

Crandall, P. et al. Dry Heat Thermal Inactivation of *Listeria innocua* on Deli Slicer Components. **Food Protection Trends**, v. 30, n. 9, p. 588-592, 2010.

EPSTEIN, A. K. et al. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 995-1000, 2011.

FAGERLUND, A. et al. *Listeria Monocytogenes* Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 792, 2020.

KANE, D. M. et al. Sanitizing in Dry-Processing Environments Using Isopropyl Alcohol Quaternary Ammonium Formula. **Journal Of Food Protection**, v. 79, n. 1, p. 112-116, 2016.

KIM, H. et al. Efficacy of chemical sanitizers against *Bacillus cereus* on food contact surfaces with scratch and biofilm. **Food Science And Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 581-590, 2019.

KOWALSKI, W. **Ultraviolet germicidal irradiation handbook**: UVGI for air and surface disinfection. Springer science & business media, 2010.

MARINO, M. et al. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2024, 2018.

MEGAHED, A.; ALDRIDGE, B.; LOWE, J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. **PIoS one**, v. 13, n. 5, 2018.

MONTGOMERY, N. L.; BANERJEE, P. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in biofilms by pulsed ultraviolet light. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 235, 2015.

NICHOLAS, R. et al. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 555-564, 2013.

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.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. HICPAC. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. Centers for Disease Control and Prevention, 2019.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied and Environmental Microbiololy**., v. 71, n. 1, p. 247-254, 2005.