

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Eficiência do processo Clean in Place (CIP) na remoção
de biofilmes formados por *Listeria monocytogenes*
simulando diferentes condições encontradas em laticínios**

Milla Gabriela dos Santos

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciência. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Milla Gabriela dos Santos
Engenheira de Alimentos

Eficiência do processo Clean in Place (CIP) na remoção de biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* simulando diferentes condições encontradas em laticínios

Orientador:

Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba

2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Santos, Milla Gabriela dos

Eficiência do processo Clean in Pace (CIP) na remoção de biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* simulando diferentes condições encontradas em laticínios / Milla Gabriela dos Santos. - - Piracicaba, 2009.
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Biofilmes 2. Contaminação de alimentos 3. Laticínios 4. Listeria I. Título

CDD 637.1277
S237e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

**Ao meu orientador Ernani Porto,
pela oportunidade, confiança e orientação.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me iluminado sempre.

Ao meu pai, pelo exemplo e por me apoiar em todas as minhas decisões.

À minha mãe, por todo amor e dedicação e por sempre acreditar mim.

Às minhas irmãs, Anelise e Aline, pelo carinho e apoio.

Às minhas eternas amigas, Priscila e Bruna Kalil, por me acompanharem durante todo esse tempo, me dando força quando eu mais precisei.

Às minhas amigas que se tornaram verdadeiras irmãs aqui em Piracicaba, Marina e Bruna Cortes, pela convivência, amizade e alegria.

À minha “grande” amiga Tarsila, pela amizade sincera, por me acolher sem medir esforços, sempre prestativa e atenciosa.

À Denise pela disposição em ajudar sempre, carinho e paciência.

Às meninas do laboratório de Higiene e Laticínios, Paula, Leilane, Natália Xavier, Natália Grigol, Bruna Travagin e Nicolle pela ajuda constante na execução do projeto.

À todas as colegas de mestrado, que compartilharam comigo todos os momentos dessa fase tão importante.

À Giovana pela amizade, orientações e sugestões no decorrer do trabalho.

À Ana Claudia Rossi por me dar base para desenvolver este projeto.

À Christiane, minha eterna orientadora.

À todos os funcionários do departamento de alimentos e nutrição, que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Elliot Kitajima, por disponibilizar o laboratório e todo o material necessário para as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Carlos Tadeu dos Santos Dias pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos demais colegas que não foram citados, mas merecem igual agradecimento e respeito.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Biofilmes bacterianos	14
2.1.1 Formação do biofilme	15
2.1.2 Resistência das células bacterianas nos biofilmes	16
2.1.3 Variáveis que influenciam na formação dos biofilmes	17
2.1.4 Biofilmes com culturas mistas	18
2.2 Biofilmes na indústria de alimentos	19
2.2.1 Biofilmes em laticínios	20
2.2.2 Processo de higienização	22
2.2.3 Processo de sanificação	24
2.2.3.1 Hipoclorito de sódio	25
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.3.1 Formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i>	27
2.4 Metodologia para avaliar biofilmes	29
3 METODOLOGIA	31
3.1 Definição do tempo ideal para adesão bacteriana	32
3.1.1 Cultura bacteriana	32
3.1.1.1 Solução Padrão McFarland	33
3.1.1.2 Preparo dos cupons de aço inoxidável	33
3.1.1.3 Condicionamento da superfície dos cupons	34
3.1.1.4 Processo de adesão e formação do biofilme	34
3.1.1.5 Contagens viáveis do biofilme	35
3.2 Influência do tempo, temperatura e substrato na formação do biofilme	36
3.2.1 Adesão das células de <i>L. monocytogenes</i> no aço inoxidável	36
3.2.2 Formação do biofilme	37
3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37

3.3 Comportamento da <i>L. monocytogenes</i> na presença de <i>E. coli</i>	38
3.3.1 Estudo das células planctônicas	38
3.3.2 Estudo das células sésseis	38
3.4 Avaliação da eficiência do processo de limpeza CIP sobre os biofilmes	39
3.5 Análise estatística	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Tempo ideal de adesão	42
4.2 Formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i>	43
4.2.1 Células planctônicas	43
4.2.2 Processo de adesão	44
4.2.3 Formação do biofilme	46
4.2.4 Influência do substrato	56
4.3 <i>L. monocytogenes</i> na presença de <i>E. coli</i>	58
4.3.1 Estudo com as células planctônicas	58
4.3.2 Estudo do biofilme de <i>L. monocytogenes</i> na presença de <i>E. coli</i>	61
4.4 Avaliação da eficiência do processo CIP	65
4.5 Superfície de aço inoxidável	71
5 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73

RESUMO

Eficiência do processo Clean in Place (CIP) na remoção de biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* simulando diferentes condições encontradas em laticínios

Laticínios são facilmente susceptíveis à contaminação por *L. monocytogenes*, que pode vir a formar biofilmes nos equipamentos e utensílios e se tornar reservatório de uma recontaminação de produtos lácteos pasteurizados. O objetivo do trabalho foi analisar a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em diferentes condições encontradas em laticínios como temperatura, tempo e presença de *E. coli*, assim como avaliar a eficiência do processo de limpeza utilizado, *Clean in Place* (CIP), frente a esses biofilmes formados. Para isso, foi utilizado um modelo experimental com cupons de aço inoxidável da mesma especificação do pasteurizador de leite. Os cupons foram imersos em um béquer contendo leite UHT integral e TSB-YE, contaminados artificialmente com uma suspensão de *L. monocytogenes*. Os cupons permaneceram durante um período de dez horas sob agitação constante a temperatura de 5 e 35°C, visando a aderência das cepas na superfície, seguida de incubação em diferentes tempos (18 e 114 horas) e temperaturas (5 e 35°C) para a formação do biofilme, seguidos do processo CIP. As populações bacterianas dos biofilmes foram avaliadas por amostragem por suabe e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi significativamente influenciada pela temperatura, sendo que a de 5°C prolongou sua sobrevivência sobre aço inoxidável, provavelmente pela formação de polímeros extracelulares, produzidos em maior número a esta temperatura. Portanto a refrigeração não deve ser usada como única forma de prevenção da contaminação dos alimentos. O substrato e a presença de *E. coli* não influenciaram na formação de biofilmes pela *L. monocytogenes*. Em todas as condições estudadas, o processo de limpeza CIP foi eficiente para remover as células de *L. monocytogenes* a níveis não detectados pelo método suabe ou tornando essas células inviáveis.

Palavras-chave: Biofilme; Laticínios; *L. monocytogenes*; MEV

ABSTRACT

Efficiency of the Clean in Place (CIP) process in the removal of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* simulating different conditions found in dairy industries

Dairy industries are easily susceptible to contamination by *L. monocytogenes*, which could form biofilms in equipments and utensils and become a source of recontamination of pasteurized dairy products. The objective of this work was to analyze the formation of biofilms by *L. monocytogenes* at different conditions found in dairy industries such as temperature, time and presence of *E. coli*, as well as to evaluate the efficiency of the cleaning process used called Clean in Place (CIP) against the biofilms formed. To do so, an experimental model with stainless steel coupons of the same specification as the milk pasteurizer was used. The coupons were immersed in a glass flask containing whole UHT milk and Tryptic Soy BOH + 0.6% Yeast Extract (TSB-YE), artificially contaminated with a suspension of *L. monocytogenes*. The coupons remained for a period of ten hours under constant agitation at temperature of 5 and 35°C, aiming at the adherence of the strains on the surface, followed by incubation at different times (18 and 114 hours) and temperatures (5 and 35°C) for the formation of the biofilm, followed by CIP process. The bacterial populations of biofilms were evaluated by sampling through swab and scanning electron microscopy (SEM). The formation of biofilms by *L. monocytogenes* was significantly influenced by temperature, and temperature of 5°C prolonged their survival on stainless steel, probably due to the formation of extracellular polymers, produced in greater numbers at this temperature. Therefore, refrigeration should not be used as the only way to prevent food contamination. The substrate and the presence of *E. coli* did not influence the formation of biofilms by *L. monocytogenes*. In all conditions studied, the CIP cleaning process was efficient to remove *L. monocytogenes* cells at levels not detected through the swab method or making these cells unviable.

Keywords: Biofilm; Dairy industries; *L. monocytogenes*; SEM.

1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores mais importantes associados com a contaminação de alimentos é a formação de biofilmes em superfícies de equipamentos utilizados na indústria. Células bacterianas aderem e formam biofilmes sobre superfícies, tornando-se mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos usados nos procedimentos de higienização. Sendo de difícil remoção, os biofilmes persistem na indústria de alimentos e, conseqüentemente, aumentam as chances de uma pós-contaminação.

Quando esses biofilmes são formados por patógenos, como *L. monocytogenes*, a preocupação aumenta, pois esse microrganismo é capaz de causar graves infecções. Incidências de listeriose tem sido associadas com vários alimentos processados, normalmente devido à recontaminação do produto. Entre os alimentos envolvidos nos surtos, os produtos de laticínios, tais como queijos, tem sido frequentemente incriminados.

Na indústria de laticínios, os processos industriais são desenvolvidos tanto em temperatura ambiente (35°C) quanto de refrigeração (5°C). O leite pode ficar em contato com as superfícies dos equipamentos por tempos que variam de poucos segundos, como no pasteurizador, ou por várias horas, como em tanques de estocagem ou de coagulação, oferecendo diferentes tempos de contato da *L. monocytogenes* com a superfície. Além disso, no ambiente de laticínios, a *L. monocytogenes* estará sempre acompanhada de uma microbiota contaminante.

Para desenvolver estratégias efetivas visando minimizar a presença da *L. monocytogenes* dentro do ambiente de processamento, torna-se necessário entender a formação de biofilmes por este patógeno. Diante disto, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade da *L. monocytogenes* em formar biofilmes simulando condições encontradas em laticínios, usando superfície de aço inoxidável, diferentes temperaturas, tempos de formação e presença de outros microrganismos. Além disso, foi avaliado o processo de limpeza comumente utilizado nos laticínios, *Clean in Place* (CIP), frente aos biofilmes formados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofilmes bacterianos

Os microrganismos podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua situação no ambiente: planctônicos e sésseis, sendo que no estágio planctônico, os microrganismos vivem livremente como organismos flutuantes individuais, enquanto na fase sésil, se encontram aderidos à uma superfície, formando os biofilmes e funcionando como uma comunidade integrada (POULSEN, 1999).

O primeiro estudo científico sobre biofilmes foi publicado por Zobell em 1943. Mas somente na década de 1970 verificou-se que a ocorrência de biofilmes era um fenômeno comum na natureza (ARCURI, 2000). Marshall em 1976 apud Donlan e Costerton (2002) notou que fibras de polímeros extracelulares muito finas fixavam a bactéria na superfície. Costerton et al. (1987) observaram que comunidades de bactérias aderidas estavam envolvidas por uma matriz de glicocálix, que auxiliava na adesão e afirmaram que biofilmes eram formados de células individuais e microcolônias, todas embebidas em uma matriz altamente hidratada, predominantemente de exopolímeros. Substâncias orgânicas e abióticas poderiam estar retidas juntamente com a matriz do biofilme (CHARACKLI; COOKSEY, 1983).

Biofilmes são definidos como microrganismos que aderem e proliferam sobre superfícies sólidas, com uma matriz de polímeros extracelulares (EPS) ao redor delas mesmas e com uma estrutura complexa multicelular (KUMAR; ANAND, 1998; COSTERTON et al. 1995; DONLAN; COSTERTON, 2002). A composição da EPS pode variar e ser composta de carboidratos e proteínas, e em menor parte, de outras substâncias como lipídeos e DNA (LIU; LIU; TAY, 2004). Microrganismos em biofilmes possuem alterada razão de crescimento e transcrevem genes que organismos planctônicos não transcrevem (DONLAN; COSTERTON, 2002). Costerton et al. (1995) constataram que o processo de formação de biofilmes é regulado por genes específicos transcritos durante a adesão celular inicial.

2.1.1 Formação do biofilme

Existem várias teorias para descrever as etapas de formação do biofilme. Marshall, Stout e Mitchell (1971) afirmaram que a adesão é um processo que ocorre em duas fases. Na primeira, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do microrganismo na superfície ocorrer por forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix.

Outra teoria (CHARACKLI; COOKSEY, 1983) sugere cinco etapas para a formação de biofilmes: 1)- transporte de nutrientes, inorgânicos e orgânicos para a superfície sólida; 2)- condicionamento da superfície pela adsorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos; 3)- início do processo de adesão bacteriana; 4)- alta atividade metabólica do biofilme; 5)- liberação de células localizadas na periferia.

A teoria proposta por Nortermans, Dormans e Mead (1991), indica a formação do biofilme em três etapas: 1)- adesão da bactéria sobre a superfície; 2)- consolidação da bactéria na superfície, formando polímeros; 3)- colonização e reprodução da bactéria. Após a etapa inicial de adesão, a bactéria começa a produzir material extracelular e a adesão torna-se irreversível (consolidação). Os materiais extracelulares produzidos ajudam o organismo a proliferar sobre a superfície (colonização). A Figura 1 descreve as principais etapas de formação do biofilme:

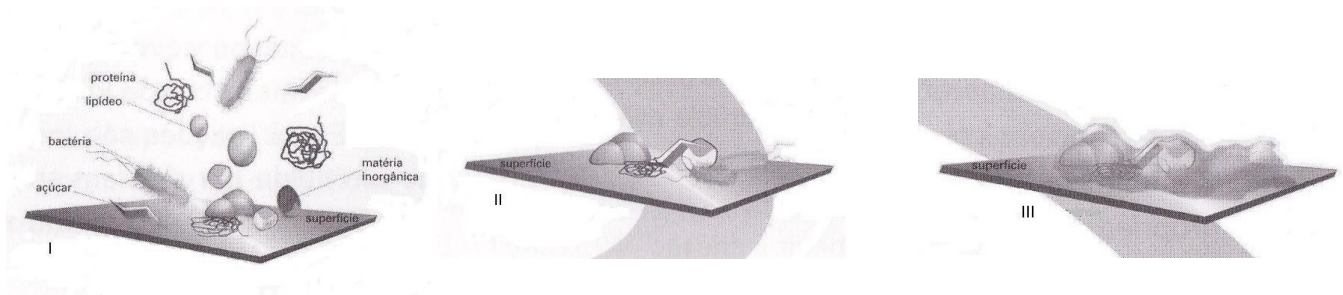


Figura 1 - Mecanismo teórico de formação do biofilme. I – Início da adesão; II – Adesão bacteriana e síntese de exopolissacarídeo; III – Biofilme bacteriano

Fonte: Andrade (2008).

Um modelo descrevendo as etapas em função da distância entre as bactérias e a superfície foi proposto por Busscher e Weerkamp (1987). Quando as distâncias são maiores que 50 nm, somente forças de longo alcance operam e a adesão é reversível. Com a distância próxima de 20 nm, tanto forças de longa distância quanto forças eletrostáticas estão operando. Esta etapa pode ser reversível, mas com o tempo se torna irreversível. A terceira etapa ocorre a distâncias menores que 15 nm, onde além das forças ocorre a produção de polímeros, tornando a adesão irreversível.

2.1.2 Resistência das células bacterianas em biofilmes

Uma vez formado o biofilme as células bacterianas se protegem no seu interior, através de estratégias básicas de sobrevivência (DONLAN; COSTERTON, 2002), como uma natureza estrutural e mudanças fisiológicas das células que conferem resistência a agentes antimicrobianos (PARIZZI, 1998).

Os mecanismos responsáveis por essa resistência podem estar relacionados com a presença de uma matriz extracelular, a qual pode atuar como uma barreira para moléculas dificultando a penetração do agente antimicrobiano (DONLAN; COSTERTON, 2002; PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003) e ajudando as células a aderirem firmemente sobre as superfícies (RONNER; WONG, 1993). A resistência adquirida pelos biofilmes ao tratamento com agentes sanificantes provavelmente é função das substâncias polímeras extracelulares e não aos atributos intrínsecos das células em biofilmes (PAN; BREIDT; KATHARIOU, 2006).

A associação inicial da bactéria com a superfície, com limitação de nutrientes ou o acúmulo de metabólitos tóxicos (DONLAN; COSTERTON, 2002), pode resultar na repressão ou indução de genes, os quais resultam em mudanças fisiológicas (DAGOSTINO; GOODMAN; MARSHALL, 1991), conferindo resistência às células bacterianas.

A resistência do biofilme bacteriano ao processo de limpeza e sanificação é fortemente influenciada pelo tipo de superfície (FRANK; CHMIELEWSKI, 1997; KRYSINSKI; BROWN; MARCHISELLO, 1992; MARQUES et al., 2007; RONNER; WONG, 1993; SPEERS; GILMOUR, 1985; WONG, 1998), tempo de formação do biofilme (SOMERS; WONG, 2004), tempo de contato com os agentes químicos

(BREMER; MONK; BUTLER, 2002), temperatura (FOLSOM; FRANK, 2006; MARQUES et al., 2007), espécie bacterianas presentes (BREMER; MONK; BUTLER, 2002; FATEMI; FRANK, 1999; RONNER; WONG, 1993; SPEERS; GILMOUR, 1985; WALTON et al., 2008) e matriz de crescimento (BEST; KENNEDY; COATES, 1990; FOLSOM; FRANK, 2006; GRAM et al., 2007; WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992b).

2.1.3 Variáveis que influenciam na formação do biofilme

A temperatura é o fator ambiental mais importante na multiplicação de microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 2002); entretanto existe pouca informação sobre o efeito da temperatura na adesão de microrganismos patogênicos à superfícies usadas na indústria de alimentos (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

Outro fator é o tempo de adesão e maturação do biofilme. Um biofilme pode ser formado dentro de poucas horas, porém um biofilme maduro pode levar dias ou semanas para atingir um perfeito equilíbrio (ARCURI, 2000). Wirtanen e Mattitila-Sandholm (1992b) constataram que um tempo mínimo de 48 horas foi requerido para *L. monocytogenes* produzir glicocálix a 25°C sobre superfícies. A idade do biofilme afeta a resistência do microrganismo ao sanificante (LEE; FRANK, 1991; WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992b), portanto, biofilmes formados nas superfícies dos equipamentos se tornam cada vez mais difíceis de remover com o passar do tempo, sendo este processo conhecido como maturação (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Lee e Frank (1991) encontraram que *L. monocytogenes* aderidas por 8 dias eram 100 vezes mais resistente ao hipoclorito de sódio (200 ppm) que aquelas aderidas por somente 4 dias, mesmo a população atingindo uma contagem similar (5 log UFC/cm²) em ambos os tempos. Anwar et al. (1992) encontraram que biofilmes de 10 dias de *Pseudomonas aeruginosa* eram mais resistentes à tobramicina e piperacilina do que biofilmes de 2 dias. Os mecanismos pelo qual a bactéria em biofilmes resiste aos antibióticos parecem similar ao mecanismos de resistência aos sanificantes (BOWER; McGUIRE; DAESCHEL, 1996).

Costerton et al. (1995) relataram que superfícies lisas são colonizadas tão facilmente como superfícies rugosas e as características físicas da superfície

influenciam a adesão bacteriana somente em menor grau. Há divergências em relação a adesão de *L. monocytogenes* em diferentes superfícies. Estudos afirmam que a formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi significativamente maior sobre o vidro quando comparado com o aço inoxidável e polipropileno (DiBONAVENTURA et al., 2008). Djordjevic, Wiedmann e McLandsborough (2002), observaram que a formação de biofilme foi maior sobre PVC do que sobre o aço inoxidável, enquanto Chavant et al. (2002) observaram que foi mais rápida sobre aço inoxidável. A hidrofobicidade pode ser um dos muitos fatores envolvendo a adesão inicial do microrganismo à superfície (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Blackman e Frank (1996) demonstraram que *L. monocytogenes* foi hábil para formar biofilmes tanto em superfícies hidrofóbicas (Teflon) quanto hidrofílicas (aço inoxidável). Em relação à remoção desses biofilmes, Krysinski, Brown e Marchisello (1992) relataram que, sobre aço inoxidável, biofilmes de *L. monocytogenes* são removidos mais facilmente do que em plástico.

Além da temperatura, tempo e superfície, diferentes cepas de *L. monocytogenes* exibem variações no comportamento de formação do biofilme (DJORDJEVIC; WIEDMANN; McLANDSBOROUGH, 2002; BORUCKI et al., 2003; MOLTZ; MARTIN, 2005; FOLSOM; FRANK, 2006). Djordjevic, Wiedmann e McLandsborough (2002) sugeriram uma potencial relação entre cepas formadoras de biofilme e isolados virulentos que causam listeriose. Norwood e Gilmour (1999) testaram 111 cepas de *L. monocytogenes* aderidas sobre cupons de aço inoxidável e observaram que houve diferença significativa na aderência entre os sorotipos. Kalmokoff et al. (2001) encontraram somente uma cepa de *L. monocytogenes* formadora de biofilme, enquanto todas as outras, inclusive “Scott A”, somente aderiam como células isoladas na superfície. Entretanto, Chae e Scharaft (2000) concluíram que todas cepas investigadas, inclusive Scott A, formam biofilmes. Outras pesquisas (O'TOOLE; KOLTER, 1998; HERALD; ZOTTOLA, 1988) tem descrito uma influência positiva dos flagelos e motilidade sobre os diferentes estágios de formação do biofilme.

2.1.4 Biofilmes com culturas mistas

Em um ambiente de processamento de alimentos existe uma ampla variedade de microrganismos e isso influencia a formação do biofilme (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

Sasahara e Zottola (1993) estudando a adesão e formação do biofilme sobre vidro e aço inoxidável por *Pseudomonas fragi* e *L. monocytogenes*, concluíram que, quando crescem juntos, esses microrganismos formam um biofilme mais complexo do que quando crescem independentes e que *Pseudomonas fragi* foi predominante ao formar glicocálix e biofilme. Costerton et al. (1987) relataram que muitas células bacterianas em ambiente competitivo, secretam uma longa fibra polissacarídea a qual serve para unir o microrganismo a superfície.

Trabalho realizado por Driessen, Vries e Kingma (1984) constatou que a população de *Streptococcus thermophilus* aderidas em aço inoxidável aumentou mais rapidamente quando na presença de leite pasteurizado do que na presença de leite cru, provavelmente pelo fato do leite cru conter microrganismos que produzem compostos inibitórios. A presença de *Listeria* em laticínios está associada com muitos outros tipos de microrganismos, como *Staphylococcus* e *Lactobacillus* (FRANK; GILLET; WARE, 1990). Trabalho realizado por Catão e Ceballos (2001) constataram que existe uma relação direta entre os altos índices de coliformes no leite e a presença de *Listeria* ssp.

Escherichia coli são bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás, sendo a maioria também fermentadora da lactose (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Trabalhos relatam a ocorrência de *E. coli* em produtos lácteos (LISITA, 2005), levando a conclusão de que, provavelmente a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em laticínios pode estar associada com *E. coli*.

2.2 Biofilmes na indústria de alimentos

O conceito de biofilmes bacterianos em indústrias de alimentos é relativamente novo (ZOTTOLA, 1994), sendo Zoltai, Zottola e McKay (1981), os primeiros a publicarem trabalho sobre a adesão de bactérias sobre superfícies inertes que entram em contato com alimento. Esses autores observaram o crescimento de células de *Pseudomonas fragi* sobre cupons de aço inoxidável e vidro. Hoje, sabe-se que a maioria das bactérias são capazes de formar biofilmes sobre uma ampla variedade de superfícies, causando sérios problemas na indústria (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Através da matéria-prima *in natura*, do ambiente, dos manipuladores e de outras fontes, os microrganismos entram na linha de produção (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000). Uma vez dentro do ambiente de processamento de alimentos, encontram condições favoráveis à formação de biofilmes, como superfícies para adesão, ampla distribuição de nutrientes (GIBSON et al., 1999), processamento de alimentos com produção em massa e operação de equipamentos por longo turno (LINDSAY; VON HOLY, 2006). O processo de automação das indústrias e o desenvolvimento de equipamentos mais complexos propiciam um grande número de nichos para a adesão e o crescimento de microrganismos, contribuindo assim para o aumento da formação de biofilmes (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997). Por esses motivos, há um crescente interesse por biofilmes bacterianos na indústria de alimentos.

Biofilmes podem ser desejáveis ou indesejáveis na indústria de alimentos. Exemplo de biofilmes benéficos são aqueles existentes em biorreatores para produção de fermentados. Podem ser indesejáveis sob diversos aspectos, como diminuição da transferência de calor em trocadores de calor, diminuição do fluxo de tubulações ou desencadeando processos corrosivos (ZOTTOLA, 1994). No que se refere aos aspectos microbiológicos a adesão pode constituir-se de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, que resultam em sérios problemas de higiene, de saúde ou de ordem econômica (ANDRADE, 2008).

Não é conhecido se a persistência de patógenos no ambiente de processamento é resultado da adaptação de certos organismos, de falhas na limpeza e desinfecção ou da habilidade de organismos desenvolverem tolerância por alguns produtos usados (GRAM et al., 2007).

2.2.1 Biofilme em laticínios

Por sua composição completa e balanceada, o leite é um substrato ideal para o desenvolvimento de diversos grupos de microrganismos. Bactérias, leveduras e fungos podem provocar significativas alterações no leite e mesmo sua contaminação (TRONCO, 2003). O leite é um exemplo de substrato heterogêneo, com uma complexa mistura de numerosos tipos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais (OULAHAL et al., 2008), além de suas características intrínsecas, como alta atividade de água e pH próximo ao

neutro (FRANCO; LANDGRAF, 2002), sendo um excelente meio de cultura para os microrganismos.

O emprego de programas de resfriamento do leite na fazenda após a ordenha, com posterior coleta e transporte em caminhões-tanque isotérmicos, tem aumentado significativamente a qualidade do leite produzido. No entanto, com o uso da refrigeração, ocorre o predomínio de bactérias psicotróficas (SANTOS; LARANJA DA FONSECA, 2001), como a *L. monocytogenes*, que apresentam boa capacidade de crescimento mesmo a baixas temperaturas.

A qualidade de todos os produtos derivados do leite dependerá, basicamente, das condições microbiológicas da matéria-prima (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Uma vez que o leite contaminado entra em contato com superfícies usadas durante o processamento e estocagem (OULAHAL et al., 2008), as bactérias aderem sobre essas superfícies e tornam-se fontes de recontaminação. Assim, as principais fontes de recontaminação do leite são os equipamentos utilizados durante a manipulação, o transporte, o processamento e o armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Antes dos anos 1990, o controle de biofilmes bacterianos em laticínios recebeu relativamente pouca atenção, os procedimentos de limpeza eram designados para remover apenas proteínas e minerais (GIBSON et al., 1999). Porém, nos processos de tratamento térmico do leite ocorre, em geral, a formação de depósitos incrustantes sobre as superfícies de troca térmica dos equipamentos, os quais proporcionam um meio propício à adesão microbiana, além de provocar uma diminuição na área de troca de calor prejudicando o tratamento térmico e, conseqüentemente, a qualidade microbiológica do produto (PASSOS, 1994).

Períodos prolongados de operação de pasteurizadores de leite podem elevar as contagens de microrganismos nas horas finais de processamento, provocadas pela adesão e formação de biofilmes na superfície das placas do trocador de calor (DRIESSEN; VRIES; KINGMA, 1984). Se houver falhas no processo de higienização, bactérias podem vir a formar biofilmes sobre superfície dos equipamentos, como nas placas do pasteurizador de leite, podendo contaminar o leite pasteurizado e assim afetar a qualidade dos produtos lácteos (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997).

2.2.2 Processo de higienização

Um dos aspectos mais importantes na garantia da qualidade na indústria de alimentos é a higiene, que tem como finalidade assegurar a qualidade sanitária final do produto e preservar a saúde do consumidor. Desde 1919 associações propõem recomendações de limpeza para garantir a segurança dos alimentos (RIDENOUR; ARMBRUSTER, 1953). Atualmente, em função de diversos fatores, como o aumento de concorrência com os produtos importados, consumidor mais exigente e fiscalização sanitária mais acirrada, muitas indústrias aumentaram os investimentos na área de higienização (LANGSRUD et al., 2003).

O processo de higienização é dividido em duas etapas bem definidas: a limpeza e a sanificação. O objetivo primordial da limpeza é a remoção de resíduos orgânicos, tais como gorduras e proteínas, e de minerais aderidos às superfícies, enquanto a sanificação tem por objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos deteriorantes a níveis considerados seguros (ANDRADE, 2008). O processo de limpeza envolve o uso de detergentes e é um importante passo antes da aplicação do sanificante (WALTON et al., 2008), pois se a etapa de limpeza for insuficiente, o sanificante reage inicialmente com resíduos e ao final, pouca atividade resta para agir sobre os microrganismos no biofilme (ARCURI, 2000). Detergentes não são considerados agentes antimicrobianos (GIBSON et al. 1999), embora reduzam a carga microbiana das superfícies, porém não a índices satisfatórios, por isso, a sanificação é indispensável (ANDRADE, 2008), sendo a limpeza e sanificação etapas complementares (GIBSON et al., 1999).

Nas indústrias de laticínios, é frequente o uso do processo *Clean in Place* - CIP, que é um sistema automático, onde os equipamentos e tubulações são higienizados sem desmontagem. Normalmente, consiste em um pré-enxágue com água à temperatura de 38°C a 46°C para a remoção de resíduos grosseiros, seguido pela circulação de solução alcalina à temperatura de 80°C, enxágue para remoção do alcalino, circulação de solução ácida à temperatura de 70°C, e novo enxágue. A lavagem alcalina é realizada geralmente com hidróxido de sódio e a ácida com ácido nítrico ou fosfórico, produtos originalmente selecionados pela habilidade de remover resíduos orgânicos (proteínas e lipídios) e inorgânicos (fosfato de cálcio e outros

minerais), respectivamente. Para melhorar o controle da contaminação microbiana, o sistema CIP pode ser complementado com sanificantes (ANDRADE, 2008). Por meio de circulação dessas soluções, podem ser higienizadas tubulações, válvulas, bombas, centrifugas, pasteurizadores, evaporadores, dentre outros. Estudos demonstram a eficácia do processo CIP na presença de resíduo de leite (BREMER; FILLERY; McQUILLAN, 2006; DUFOUR; SIMMONDS; BREMER, 2004; GÂNDARA; OLIVEIRA, 2000; GUNDUZ; TUNCEL; 2006).

Estudo realizado por Stone e Zottola (1985) analisando a eficiência do processo CIP contra células aderidas de *Pseudomonas fragi* observaram que quando as soluções de limpeza foram usadas de acordo com o recomendado, células viáveis não foram detectadas, porém quando usados em concentrações abaixo do recomendado, células viáveis foram encontradas. Não é difícil imaginar casos na indústria de processamento de alimentos onde não são seguidas as recomendações mínimas exigidas, e como comprovado no estudo, quando isto ocorre, restam algumas células no ambiente, sendo isto a causa da adesão, multiplicação e formação do biofilme.

Na indústria de alimentos, as bactérias são isoladas especialmente em áreas nas quais são inacessíveis os processos de limpezas usuais (LUNDÉN et al., 2000; NELSON, 1990). O tempo avaliado para formação do biofilme vai depender da frequência e eficiência do processo de limpeza, portanto o procedimento mais efetivo no combate a formação de biofilmes é uma eficiente e eficaz higienização (GIBSON et al., 1999).

Uma higienização inadequada dos equipamentos e utensílios é a principal causa para adesão e proliferação dos microrganismos sobre a superfície (FRANCO; LANDGRAF, 2002; MACEDO, 2000; SPEERS; GILMOUR, 1985), formando-se os biofilmes, os quais podem não ser eliminados, pois adquirem resistência aos processos de limpeza e sanificação, sendo uma potencial fonte de contaminação (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003).

2.2.3 Processo de sanificação

Os sanificantes utilizados na indústria, dentro das condições indicadas pelos fabricantes, são aprovados em testes como os de suspensão e diluição de uso, porém, isso não reflete adequadamente o estado que os microrganismos são encontrados na indústria de alimentos, onde formam biofilmes sobre superfícies (KATHARIOU, 2002).

É amplamente aceito o conceito de que células bacterianas em biofilmes são consideravelmente mais resistentes à sanificantes do que células planctônicas (DHALIWAL; CORDIER; COX, 1992; FRANK; KOFFI, 1990; HOLAH et al., 1990; RONNER; WONG, 1993; WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992a). Uma vez aderidos às superfícies de aço inoxidável, vidro, polipropileno e borracha, apresentam diferentes respostas ao processo de higienização (FRANK; KOFFI, 1990; MAFU et al., 1990). Pesquisas comprovaram que microrganismos em biofilmes são entre 150 e 3000 vezes mais resistentes à ação do ácido hipocloroso (cloro livre, pH 7) e 2 a 100 vezes mais resistentes à monocloramina que células não aderidas (LeCHEVALIER; CAWTHON; LEE, 1988).

L. monocytogenes aderidas foram resistentes ao tratamento com benzoato de cloro (100, 400 e 800 mg/L) e a um sanificante ácido/aniônico (200 e 400 mg/L) por 20 minutos, enquanto células não aderidas foram eliminadas em 30 segundos de exposição ao sanificante (FRANK; KOFFI, 1990). Wirtanem e Mattila-Sandholm (1992a) relatam que biofilmes de *Pseudomonas fragi*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus hirae* e *Bacillus subtilis* sobre superfícies de aço inoxidável foram mais resistentes aos sanificantes que células não aderidas.

Há divergências em relação à efetividade do sanificante sobre biofilmes de *L. monocytogenes* formados sobre aço inoxidável. Bremer, Monk e Butler (2002) observaram que o tratamento com solução básica de NaOH (pH 11) foi menos efetivo que todos os tratamentos com cloro, sendo que o número de *L. monocytogenes* diminuiu com o aumento do tempo de exposição a todas as concentrações de hipoclorito de sódio (200, 400 e 600 mg/L), inativando 99,8% (menor que 2 Log UFC/cm²) das células viáveis após 20 minutos de contato.

Marques et al. (2007) avaliaram a eficiência do dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* e

concluíram que o ácido peracético apresentou uma eficiência maior na remoção das células aderidas, apresentando redução decimal de 5,26 (vidro) e 4,50 (aço inoxidável) UFC/cm². Outro estudo com biofilmes de *S. aureus* sobre aço inoxidável, realizado por Frank e Chmielewski (1997) concluiu que não houve diferença significativa entre os sanificantes (compostos de quaternário de amônio e hipoclorito de sódio) na mesma concentração (200 mg/L) após 10 segundos de exposição a temperatura ambiente, reduzindo a contagem de *S. aureus* para números menores que 10 UFC/cm².

2.2.3.1 Hipoclorito de sódio

O uso de derivados clorados de origem inorgânica, como gás cloro, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e dos derivados clorados de origem orgânica, cujo principal representante é o dicloroisocianurato de sódio, tem contribuído para o controle das doenças de origem hídrica e alimentar (MACEDO, 2000).

O cloro é o halogênio mais comum, sendo encontrado como um gás amarelo-esverdeado, de cheiro forte e irritante. Foi obtido pela primeira vez em 1774, por K.W. Sheele, pela reação de dióxido de manganês com ácido clorídrico. Atualmente, é fabricado em grande escala, pela eletrólise de solução concentrada de cloreto de sódio (MACEDO, 2000). A ação do hipoclorito de sódio (NaOCl) deve-se essencialmente à liberação de cloro ativo, que age inibindo a reação enzimática no interior da célula, desnaturando e inativando o ácido nucléico (PAULING, 1972; McDONNELL; RUSSEL, 1999), por isso é considerado um poderoso agente germicida, sendo usado em todo o mundo na purificação da água potável e como sanificante industrial (RUSSEL, 1994). Dos produtos clorados o mais utilizado atualmente, em função do custo e da disponibilidade do produto é o hipoclorito de sódio (MACEDO, 2000).

Atualmente, o cloro é amplamente usado como sanificante na indústria de alimentos e alguns trabalhos tem sido publicados sobre sua eficácia contra células livres (AARNISALO et al., 2000; BEST; KENNEDY; COATES, 1990; DHALIWAL; CORDIER; COX, 1992; FOLSOM; FRANK, 2006; TUNCAN, 1993; WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992a) e células aderidas (BREMER; MONK; BUTLER, 2002; FRANK; CHMIELEWSKI, 1997; GRAM et al., 2007; KRYSINSKI; BROWN;

MARCHISELLO, 1992; LEE; FRANK, 1991; MARQUES et al., 2007; PAP; KISKÓ, 2008; SOMERS; WALTON et al., 2008; WONG, 2004).

A atividade do cloro sobre os biofilmes é particularmente alta, pois age sobre os polímeros extracelulares e quebra a integridade física do biofilme (PAP; KISKÓ, 2008). Assim, a habilidade das células de *L. monocytogenes* em sobreviver à exposição ao cloro pode estar mais associada com a quantidade de polímeros extracelulares produzidos pelas células do biofilme do que com o número de células contidas no biofilme (FOLSOM; FRANK, 2006).

Biofilmes de *Listeria* exibem máxima resistência ao cloro depois de crescer por 48 horas em meio contendo leite e depois de 144 horas em meio contendo carne (WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992b), portanto sua resistência é dependente da matriz de crescimento, concentração de íons e temperatura (FOLSOM; FRANK, 2006).

Norwood e Gilmour (1999) constataram que numa cultura planctônica, 100% dos microrganismos foram destruídos quando expostos a 10 mg de cloro livre/L em 30 segundos, quando em biofilmes uma redução de 2 log nas contagens bacterianas foi atingida somente com exposição a 1000 mg de cloro livre/L após 20 minutos.

2.3 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo e patogênico para homens e animais (DONNELLY, 2002). Células jovens, quando observadas ao microscópio apresentam-se na forma lisa, medindo de 1,0 a 2,0 μ por 0,5 μ . Após três a cinco dias de incubação, no entanto, apresentam-se como bacilos longos, medindo de 6 a 20 μ . É uma bactéria psicrotrófica, apresentando crescimento na faixa de 2,5°C a 44°C (FRANCO; LANDGRAF, 2002), e por isso é comumente encontrada em áreas frias da indústria de alimentos (TUNCAN, 1993), podendo proliferar em alimentos mantidos nessas condições (WILKINS; BOURGEOIS; MURRAY, 1972; RODRIGUES et al., 2007).

O meio primário de transmissão do patógeno para humanos é o consumo de alimentos contaminados (KATHARIOU, 2002). Grande parte dos surtos e casos esporádicos de listeriose ocorridos no mundo tem implicado *L. monocytogenes* como um dos principais patógenos de infecção alimentar (DONNELLY, 2002). Devido à

severidade das infecções por *Listeria*, cuja taxa de mortalidade pode alcançar cerca de 50%, e por não ser conhecida ainda a dose mínima infectante, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) estabeleceu a norma de ausência em 25g para queijos frescos, onde o resultado da determinação de *L. monocytogenes* deve ser expresso como presença ou ausência na alíquota analisada. A razão para a alta exposição de *L. monocytogenes* e a baixa prevalência de listeriose pode ser devido à diferença na virulência da *L. monocytogenes* e existência de grupos vulneráveis humanos (NORTERMANS et al., 1998; RASMUSSEN et al., 1995).

A prevenção da contaminação por bactérias patógenas, como *L. monocytogenes*, na indústria de alimentos tem sido um desafio (FRANK; GILLET; WARE, 1990), devido à sua ampla distribuição na natureza (solo, água, vegetais, insetos, seres humanos), combinado com sua resistência à desidratação sobre superfícies sólidas, sua persistência em biofilmes, ampla faixa de desenvolvimento de temperatura e de pH (FRANCO; LANDGRAF, 2002). Durante o processamento, podem facilmente contaminar os alimentos; os quais são reservatório, possibilitando assim a entrada da *L. monocytogenes* no trato digestivo do consumidor (FARBER; PETERKIN, 1991). Dentre as indústrias de alimentos, laticínios são facilmente suscetíveis à contaminação com *Listeria* spp. (FRANK; GILLET; WARE, 1990; JEONG; FRANK, 1994a; NELSON, 1990; WONG, 1998) e surtos de listeriose envolvendo produtos lácteos são frequentemente relatados (BILLE et al., 2006; HOF, 2003), comprovando assim a importância da *L. monocytogenes* na indústria de laticínios. Nelson (1990) encontrou uma incidência de 10% (566) das amostras positivas de *Listeria* em produtos e ambientes de laticínios, sendo que 78% eram *L. monocytogenes*.

2.3.1 Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*

O interesse por biofilmes na indústria de alimentos é resultado do alto número de infecções alimentares causadas por patógenos emergentes, como a *L. monocytogenes* (ZOTTOLA, 1994). Esta bactéria tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos na década de 1980, devido à eclosão de diversos surtos de listeriose humana. Um deles, publicado no Centers for Disease Control (CDC), citado por Donnelly, Briggs e Donnelly (1987), relatou que a listeriose estava associada com o

consumo de leite pasteurizado, porém, observaram que não houve falhas na pasteurização, concluindo assim a existência de mecanismos de sobrevivência da *L. monocytogenes* em leite pasteurizado, mas que até então permaneciam desconhecidos.

Foi apenas em 1988, que Herald e Zottola publicaram os primeiros estudos sobre a adesão de *L. monocytogenes* em superfícies de indústria de alimentos. A partir daí, numerosos estudos tem examinado o desenvolvimento de biofilmes por *L. monocytogenes* sobre vários tipos de superfícies (DJORDJEVIC; WIEDMANN; McLANDSBOROUGH, 2002; HELKE; WONG, 1994; MAFU et al., 1990), temperaturas (CHAVANT et al., 2002; FARRAG; MARTH, 1991; JEONG; FRANK, 1994b; MOLTZ; MARTIN, 2005), meio de crescimento (GRAM et al., 2007), seu comportamento em resposta a sanificantes (AARNISALO et al., 2000; FOLSOM; FRANK, 2006; GIBSON et al., 1999) e na presença de competidores (FARRAG; MARTH, 1991).

Prevenção da contaminação por *L. monocytogenes* em produtos pasteurizados é um fator importante em todas as indústrias de laticínios (FRANK; GILLET; WARE, 1990). Quando a *L. monocytogenes* é isolada de alimentos processados, como produtos de leite fluido pasteurizados, normalmente não é resultado de um processamento térmico inadequado, visto que a pasteurização utilizada em laticínios fornece segurança (BECKERS; SOENTORO; DELFGOU-VAN ASCH, 1987; FARBER et al., 1992), mas sim, uma contaminação pós-processamento (FARRAG; MARTH, 1989).

Estudos efetuados em criações animais constataram que a incidência de *L. monocytogenes* nas rações animais e nas fezes foi baixa, porém, após o transporte e durante o abate dos animais a contagem do microrganismo e a porcentagem de amostras positivas aumentaram consideravelmente (FENLON; WILSON; DONACHIE, 1996). O mesmo fenômeno ocorre em laticínios, onde a prevalência de *L. monocytogenes* no leite cru é baixa (OLIVEIRA et al., 2009; NERO, 2005), porém no laticínio a prevalência é alta (KABUKI, 2004). Estudos comprovam a presença de *L. monocytogenes* em laticínios, com alta prevalência em equipamentos e no ambiente (PRITCHARD; FLANDERS; DONNELLY, 1995).

Trabalho realizado por Kabuki (2004) em três indústrias processadoras de queijo tipo Hispânico, nos Estados Unidos, constatou que a permanente contaminação ambiental pode representar uma fonte importante de contaminação do produto final (KABUKI, 2004). Estudo realizado por Pak et al. (2002) durante 10 anos em laticínios da Suíça, confirmou a presença de *L. monocytogenes* em uma ampla variedade de produtos lácteos, assim como no ambiente de processamento. Catão e Ceballos (2001) revelaram a presença de *L. monocytogenes* em amostras de leite pasteurizado, sugerindo a possibilidade de contaminação pós-pasteurização. Miettinen, Bjorkroth e Korkeala (1999) analisou a presença de *L. monocytogenes* em uma indústria de sorvetes por 7 anos e *L. monocytogenes* foi erradicada do equipamento de embalagem, o qual foi considerado a principal fonte de contaminação dos produtos, por falhas na limpeza e desinfecção.

A contaminação pós-pasteurização do leite e produtos lácteos está geralmente associada à limpeza deficiente dos equipamentos para embalagem ou contaminação através do ar (NELSON, 1990). Provavelmente coloniza o ambiente de processamento, incluindo os equipamentos (FARBER; PETERKIN, 1991) e causa uma recontaminação dos produtos. Para prevenir infecções de origem alimentar por *L. monocytogenes* é necessário que haja um controle no local de processamento do alimento, fazendo o controle do microrganismo nos pontos de origem da matéria-prima através de medidas que minimizem as chances de contaminação, como a limpeza e sanificação dos equipamentos (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

2.4 Metodologia para avaliar biofilmes

Um dos maiores obstáculos ao estudar biofilmes bacterianos é determinar como quantificar os resultados. Várias técnicas podem ser usadas para determinar o nível de contaminação sobre a superfície. Métodos diretos incluem: remoção das células e contagem por métodos de plaqueamento tradicionais e contagens diretas das células usando técnicas microscópicas. Métodos indiretos frequentemente envolvem medidas de componentes celulares que acumulam sobre a superfície, como proteínas, ATP e exopolímeros (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

Os métodos envolvendo a remoção das células podem ser inconsistentes devido a dificuldade de remover completamente as células aderidas (DUFOUR; SIMMONDS; BREMER, 2004; FOLSOM; FRANK, 2006; GRAM et al., 2007; HOOD; ZOTTOLA, 1995; PAP; KISKÓ, 2008). Entre as técnicas de remoção, a mais usada é o suabe (DONLAN; COSTERTON, 2002), que remove os biofilmes da superfície por um mecanismo de força. Isso é um fator crítico, pois é impossível determinar a força usada para remover as células, tornando as comparações entre os resultados de diferentes trabalhos difícil (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Por isso vêm sendo usados outros métodos para analisar essas células aderidas, como impedância (PAP; KISKÓ, 2008), condutância indireta (JOHANSEN; FALHOLT; GRAM, 1997) e métodos microscópicos.

Métodos para examinar e caracterizar biofilmes tem evoluído, facilitando os trabalhos de investigação. Entre os métodos microscópicos, destacam-se a microscopia de contraste, de epifluorescência, Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Outro método que tem sido utilizado em trabalhos recentes é a microscopia de força atômica (AFM), que foi inventada em 1986 (BINNING; QUATE; GERBER, 1986) e desde então, tem sido usada para imagens de células bacterianas (RODRIGUEZ; AUTIO; McLANDSBOROUGH, 2008).

Muitos trabalhos têm utilizado microscopia de epifluorescência (HOLAH; BETTS; THORPE, 1989; PARIZZI, 1998; POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000), mas a MEV é mais indicada para avaliar a interação do microrganismo com a matriz do biofilme (COSTA, 1999), possibilitando observar a colonização microbiana diretamente. A microscopia direta é importante para se obter resultados confiáveis quando se estuda a adesão de bactérias sobre superfícies (LINDSAY; VON HOLY, 1997; SURMAN et al., 1996).

Na MEV as amostras são fixadas com a ajuda de agentes químicos, como gluraldeído, paraformaldeído e ósmio (COSTA, 1999; KUMAR; ANAND, 1998; ZOLTAI; ZOTTOLA; McKAY, 1981). Para desidratação utiliza-se solventes (álcool, acetona e xileno) desidratando gradualmente a amostra para análise. Esse processo de desidratação resulta em distorções significativas da amostra, pois substâncias de polímeros extracelulares são compostas por aproximadamente 95% de água (CHARACKLI; COOKSEY, 1983) e vão se assemelhar mais com fibras do que com uma

matriz grossa gelatinosa ao redor das células. Devido às propriedades de excelente resolução, a microscopia eletrônica, apesar das limitações, continua sendo uma importante ferramenta para cientistas de biofilmes.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) vem sendo usada há mais de 20 anos para estudar a adesão de bactérias em superfícies inertes (HERALD; ZOTTOLA, 1988; LEWIS et al., 1987; SPEERS; GILMOUR, 1985), sendo ainda muito utilizada para analisar biofilmes (BORUCKI et al., 2003; BREMER; MONK; BUTLER, 2002; CHAVANT et al., 2002; DIBONAVENTURA et al., 2008; KRYSINSKI; BROWN; MARCHISELLO, 1992; MARSH; LUO; WANG, 2003; MOLTZ; MARTIN, 2005; RONNER; WONG, 1993; SASAHARA; ZOTTOLA, 1993).

3 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Higiene e Laticínios, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Todo o experimento foi realizado em Cabine de Segurança Biológica Classe II tipo A1 (Pachane Modelo 420) com 70% de recirculação e 30% de renovação de ar servido através de um filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) para o ambiente. Os béqueres, pipetas, pinças e grades de aço inoxidável utilizados foram esterilizados em estufa a 160°C por 2 horas. Foram utilizadas placas de petri e alças microbiológicas descartáveis estéreis. O experimento foi dividido em três ensaios. Primeiro estudou-se a capacidade da *L. monocytogenes* para aderir e formar biofilmes em diferentes condições encontradas nos laticínios, como tempo, temperatura e substrato. Após, seguiu-se com o estudo da *L. monocytogenes* na presença de *E. coli*. E por último, avaliou-se a eficiência do processo de limpeza CIP utilizado em laticínios frente aos biofilmes formados. Além disso, foi realizado um ensaio preliminar para definir o tempo ideal de adesão para se atingir um número máximo de *L. monocytogenes* nos biofilmes formados. Amostras em triplicata foram usadas e cada ensaio repetido em três tempos consecutivos.

3.1 Definição do tempo ideal para adesão bacteriana

3.1.1 Cultura bacteriana

L. monocytogenes foi obtida da coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Laticínios, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ-USP, Piracicaba, SP. A cultura foi mantida em Tryptic Soy Agar (TSA, Bacto™) + 0,6% Yeast Extract (YE, Bacto™) inclinados e cobertos com vaselina estéril, incubados sob refrigeração (4°C). Antes de cada experimento, a cultura foi reativada em duas transferências sucessivas, sendo a primeira em Tryptic Soy Broth (TSB, Bacto™) + 0,6% YE, com incubação a 35°C/24h e a outra em TSA-YE inclinados, incubados a 35°C/24h, utilizando alça microbiológica descartável calibrada (10 µL). O inóculo foi suspenso em Solução Salina 0,85% e a turbidez da solução ajustada a uma solução de turbidez padrão McFarland 0,5 (item 3.1.1.1). Para isso foi utilizado um cartão de fundo branco e linhas contrastantes pretas, em ambiente de luz intensa (SILVA et al., 2007). Assim, obteve-se uma suspensão contendo aproximadamente 8 log Unidade Formadora de Colônia por mL (UFC/mL) de *L. monocytogenes*. A contagem real das células nas suspensões foi aferida pela técnica de plaqueamento em profundidade em TSA-YE, com incubação a 35°C/48 horas (DOWNES; ITO, 2001). O preparo das suspensões pode ser visualizado na Figura 2.

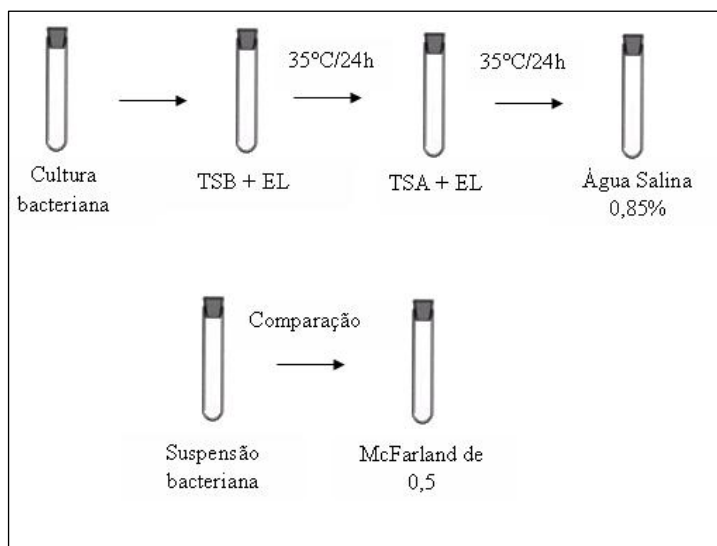


Figura 2 - Padronização dos inóculos

3.1.1.1 Solução padrão McFarland

Foi preparada uma solução padrão de sulfato de bário (BaSO_4) equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5. O BaSO_4 foi preparado acrescentando-se uma alíquota de 0,5mL de BaCl_2 de 0,048 mol/L (1,175%) a 99,5mL de H_2SO_4 de 0,18 mol/L (1%). A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro (SHIMADZU UV mini 1240) com fonte de luz de 1 cm e cubetas apropriadas para determinar a absorvância em 625 nm que variou de 0,08 a 0,10 para a solução padrão McFarland de 0,5. A suspensão de sulfato de bário foi transferida, em alíquotas de 5 mL, para tubos com tampas de rosca do mesmo tamanho daqueles usados para cultivar e diluir o inóculo bacteriano. Esses tubos foram selados hermeticamente, embrulhados em papel alumínio e armazenados em local escuro, a temperatura ambiente. O controle de turbidez de sulfato de bário foi feito através da agitação vigorosa em aparelho agitador vórtex (Phoenix Modelo AP56) antes de cada uso, para verificar se estava uniformemente túrbido (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003).

3.1.2 Preparo dos cupons de aço inoxidável

Foram preparados cupons de aço inoxidável 304 medindo 5,0 x 2,0 cm com polimento sanitário, simulando a superfície de um pasteurizador de leite. Os materiais utilizados (cupons, arames e anzóis) foram higienizados da seguinte maneira: imersão em solução de hidróxido de sódio a 1% durante 30 minutos; enxágue em água destilada; imersão em álcool 70%; enxágue em água destilada. Após higienização, foram secos em estufa (Fanem LTDA Modelo 002CB) por 2 horas e autoclavados a 121°C/15 min. Os cupons para análise MEV foram preparados da mesma maneira, porém medindo 2,5 x 3,0 cm, adaptados para encaixar no suporte do aparelho de microscopia. O cupom é exibido na Figura 3.

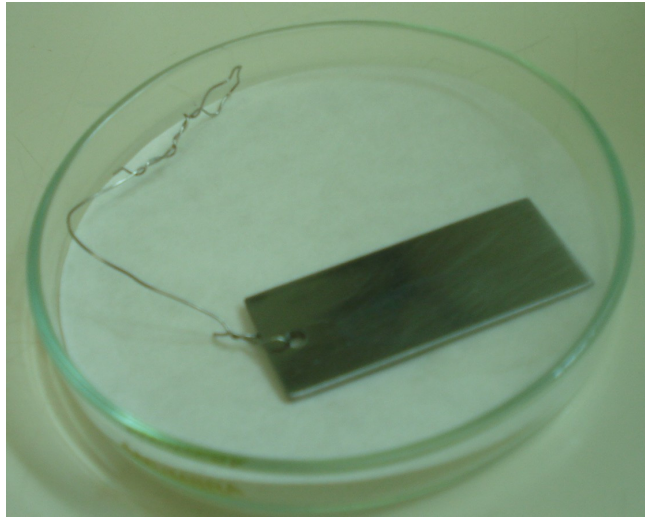


Figura 3 - Cupom de aço inoxidável utilizado no experimento

3.1.3 Condicionamento da superfície dos cupons

Com o objetivo de obter uma superfície de aço inoxidável coberta por um filme de condicionamento de leite semelhante ao encontrado em laticínios, os cupons de aço inoxidável foram pendurados verticalmente em um béquer de 2.000 mL contendo 1.800 mL de leite UHT integral. Os cupons ficaram sob agitação a 35°C/1h, em seguida foram retirados e colocados individualmente em placas de petri forradas com papel filtro estéril com a superfície de polimento sanitário voltada para cima. Foram então incubados em estufa (Tecnal Modelo TE-391) a 35°C/18h. Os leites UHT utilizados em todo o experimento foram previamente incubados em estufa a 35°C/24h para verificação de esterilidade.

3.1.4 Processo de adesão e formação do biofilme

Os cupons condicionados como descrito no item acima (3.1.3), foram retirados da placa de petri e novamente imersos em um béquer contendo 1.800 mL de leite UHT adicionados com 10 mL da suspensão de *L. monocytogenes* preparada conforme 3.1.1. O conjunto permaneceu a 35°C sob agitação por 12 horas. Os cupons foram retirados em três tempos (6, 10 e 12 horas), acondicionados individualmente em placas de petri e incubados em estufa a 35°C/18h para formação do biofilme. O esquema do modelo experimental pode ser visualizado na Figura 4.

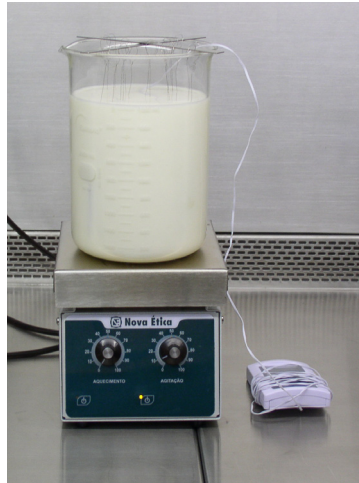


Fig. 4 – Condicionamento e adesão nos cupons

3.1.5 Contagens das células viáveis do biofilme

Os cupons contaminados e cupons controle, foram retirados da placa de petri e enxaguados com 10 mL de Tampão Fosfato pH 7,2 com auxílio de uma pipeta volumétrica, para a remoção de células não aderidas (Figura 5a). Os cupons tiveram a superfície amostrada por suabe (Figura 5b) umedecidos com água peptonada Tween 80. Os suabes foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de Tween 80 e o conteúdo destes foi homogeneizado em vórtex durante 60 segundos (Figura 5c). Destas suspensões contendo os suabes (10^0), foram retiradas alíquotas para preparo das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em tubos contendo 9 mL de Água Salina Peptonada (H_2Osp). O esquema pode ser visualizado na Figura 5.

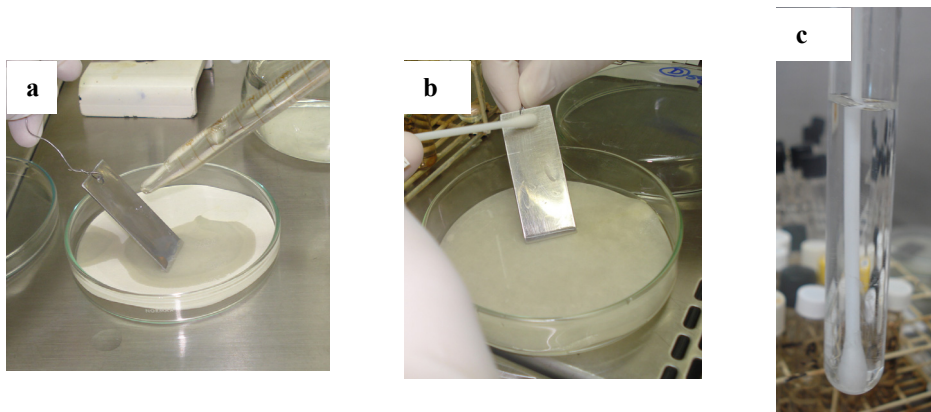


Figura 5 - Técnica de remoção por suabe. Remoção das células não aderidas pelo tampão fosfato (a); Amostragem por suabe (b); Tubo com Tween 80 e suabe, diluição 10^0 (c)

Um mililitro de cada diluição foi inoculado, em profundidade, em placas com TSA-YE, em duplicatas. As placas foram incubadas invertidas em estufa regulada a 35°C/48h (DOWNES; ITO, 2001). O esquema pode ser visualizado na Figura 6.

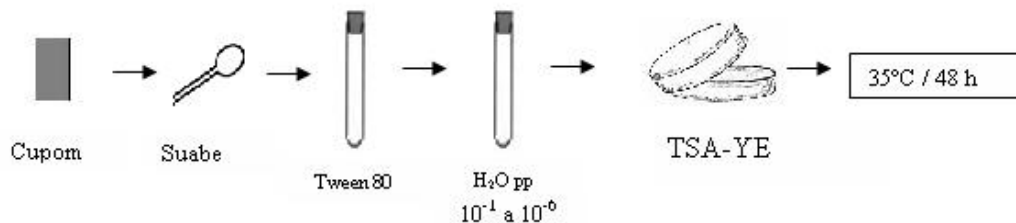


Figura 6 – Contagens das células viáveis do biofilme

Após a contagem das colônias, foi determinado o número de UFC/cm², obtido de acordo com a equação abaixo:

$$\text{UFC/cm}^2 = \text{UFC/mL da suspensão} \times \frac{\text{Área amostrada}}{\text{Volume de diluente de coleta}}$$

Fonte: SILVA et al. 2007

Para confirmação, colônias foram selecionadas e testes bioquímicos foram realizados. Para *L. monocytogenes* foram feitos testes de catalase, motilidade e coloração de Gram.

3.2 Influência do tempo, temperatura e substrato na formação do biofilme

3.2.1 Adesão das células de *L. monocytogenes* no aço inoxidável

Cupons foram preparados conforme descrito acima (item 3.1.2) e condicionados (item 3.1.1). O condicionamento dos cupons foi realizado também com TSB-YE. Cupons condicionados foram retirados da placa de petri e imersos nos respectivos béqueres. Foram preparados quatro béqueres, contendo 1.800 mL de leite UHT (5 ou 35°C) ou 1.800 mL de TSB-YE (5 ou 35°C), todos eles adicionados de 10 mL da suspensão de 8 log UFC/mL de *L. monocytogenes* (item 3.1.1). O conjunto permaneceu

durante 10 horas sob agitação para adesão das células de *L. monocytogenes* nos cupons de aço inoxidável. Após, os cupons foram incubados em estufa nas respectivas temperaturas (5 ou 35°C). Os cupons destinados à análise por MEV foram imersos apenas nos béqueres contendo TSB-YE, devido ao fato do leite atrapalhar a visualização das células. Durante a adesão os cupons foram retirados após 1, 5 e 10 horas de contato e analisados por MEV.

3.2.2 Formação do Biofilme

Para a formação do biofilme, após 10 horas do período de adesão, os cupons foram retirados e colocados em placas de petri forradas com papel filtro estéril e incubados na respectiva temperatura (5 ou 35°C). Os biofilmes foram analisados por contagens de *L. monocytogenes* por plaqueamento (item 3.1.5) após 18 e 114 horas e por MEV após 18h, 42h, 66h, 90h e 114h.

3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os cupons, em processo de adesão e após os tratamentos, foram lavados com tampão fosfato para remoção das células não aderidas e fixados em solução Karnovsky modificada, por uma semana sob refrigeração. Em seguida foi realizada a lavagem com três passagens de 10 minutos em tampão cacodilato 0,05M e pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% por 1 hora à temperatura ambiente em capela. Os cupons foram lavados em água destilada e submetidos à desidratação com acetona em concentrações crescentes (25%, 50%, 75%, 90%, 100%) permanecendo 10 minutos em cada e, na última concentração, por três vezes. Para retirar a acetona foi feita a secagem ao ponto crítico com CO₂, depois, os cupons foram montados em “stubs” (suportes) e identificados, antes de serem colocados no metalizador para o banho de ouro. Após este procedimento, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (ZEISS DSM 940 A) (ALVES, 2004). A microscopia foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da ESALQ / USP. As imagens foram capturadas com baixa magnitude para mostrar a estrutura do biofilme e alta magnitude para mostrar detalhes do biofilme. Os cupons antes e após o tratamento completo podem ser visualizados na Figura 7.



Figura 7 - Cupons antes e após ao tratamento para análises MEV

3.3 Comportamento da *L. monocytogenes* na presença de *E. coli*

3.3.1 Estudo das células planctônicas

A cepa de *E. coli* foi doada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) sendo uma cepa de referência (ATCC 11229). *E. coli* foi mantida e inoculada conforme item 3.1.1. Três béqueres foram analisados simultaneamente, um contendo apenas 10 mL de uma suspensão de *E. coli*, outro a mesma quantidade de *L. monocytogenes* e um terceiro, *L. monocytogenes* e *E. coli*. O conjunto permaneceu durante 10 horas a 35°C sob agitação. No béquer contendo a cultura mista (*L. monocytogenes* e *E. coli*) foi coletado 1 mL do leite para análise no tempo inicial (0 horas) e no tempo final (10 horas). Nas culturas puras as coletas foram realizadas em intervalos de 2 horas. Culturas puras foram inoculadas em TSA-YE e culturas mistas em Violet Red Bile Agar (VRBA - Difco™) (*E. coli*) e em *Listeria* Selective Agar (OXF; Oxoid e Oxford selective supplement) (*L. monocytogenes*). As placas foram incubadas invertidas em estufa regulada a 35°C/24h (DOWNES; ITO, 2001). A evolução da acidez foi acompanhada por titulação com NaOH 0,1N (PREGNOLATTO, 1985).

3.3.2 Estudo das células sésseis

Após preparo e condicionamento dos cupons conforme descrito acima (item 3.1.2 e 3.1.3), seguiu-se o processo de adesão da *L. monocytogenes* e *E. coli*. Cupons foram imersos nos béqueres preparados conforme 3.3.1, e permaneceram por 10 horas a 35°C sob agitação. Após, os cupons foram incubados em estufa a 35°C/18h. A contagem das células viáveis nos biofilmes formados foi realizada conforme item 3.1.5,

sendo que biofilmes com culturas mistas foram inoculadas nos meios seletivos (3.3.1). Para confirmação, colônias foram selecionadas e realizou-se os testes bioquímicos. Para *L. monocytogenes* fez-se catalase, motilidade e coloração de Gram. Para *E. coli* fez-se coloração de Gram, Voges-Proskauer (VP), Vermelho de Metila (VM), indol e citrato.

3.4 Avaliação da eficiência do processo de limpeza CIP sobre os biofilmes

Após preparo e condicionamento dos cupons conforme descrito acima (item 3.1.2 e 3.1.3), seguiu-se o processo de adesão bacteriana (3.1.4) a 35°C/10h. Após, cupons foram incubados para formação do biofilme (3.1.4) a 5 ou 35°C. Nos tempos 18 e 114 horas, os cupons foram submetidos ao processo simulado de CIP realizado em laticínios.

Para isso foram preparados sete béqueres contendo as devidas soluções de detergentes, sanificantes e águas de enxágue. Os cupons foram separados em 3 grupos: (i) controle; (ii) limpeza; (iii) limpeza e sanificação. Os cupons do grupo (ii) e (iii) foram unidos a uma grade de aço inoxidável, que foi transferida de béquer para béquer, respeitando os tempos de contato estabelecidos, os quais foram selecionados para simular o sistema CIP. Após a passagem da grade pelo béquer nº5, cupons do grupo (ii) foram retirados do conjunto, o restante dos cupons, grupo (iii) foram submetidos à etapa adicional de sanificação. Para agitação das soluções, os béqueres foram colocados sobre equipamento de agitação magnética (agitador magnético com aquecimento Nova Ética Modelo 114), com utilização de barras magnéticas esterilizadas. Nas soluções aquecidas, foram colocados termômetros digitais para o controle da temperatura. Água destilada estéril foi utilizada no preparo das águas de enxágue e das soluções, as quais foram preparadas com a utilização de vidraria volumétrica imediatamente antes do uso. O esquema do processo simulado CIP pode ser visualizado na Figura 8.

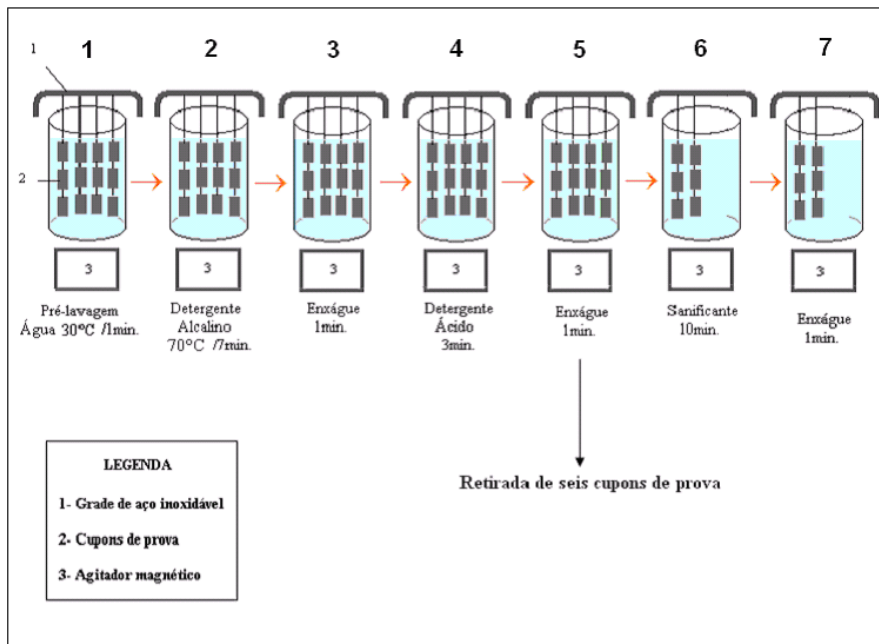


Figura 8 - Processo CIP (Fonte: ROSSI, 2008)

1. Béquer nº1: água destilada estéril a temperatura de 30°C. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto para realização da pré-lavagem, sob agitação.
2. Béquer nº2: solução de detergente alcalino (ALCA CF – SANI QUÍMICA®) à base de agente alcalinizante com concentração (15 mL/L) determinada pelo fabricante a 70°C. A grade permaneceu acoplada a este béquer por sete minutos, sob agitação.
3. Béquer nº3: água destilada estéril à temperatura ambiente para enxágue. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto, sob agitação.
4. Béquer nº4: solução de detergente ácido (ACID CF – SANI QUÍMICA®) à base de ácido fosfórico com concentração (5 mL/L) determinada pelo fabricante à temperatura ambiente. A grade permaneceu acoplada a este béquer por três minutos, sob agitação.
5. Béquer nº5: água destilada estéril à temperatura ambiente para enxágue. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto, sob agitação.

6. Béquer nº6: solução de sanificante hipoclorito de sódio na concentração de 25mg/L à temperatura ambiente. A grade permaneceu acoplada a este béquer por 10 minutos, sob agitação.
7. Béquer nº7: água destilada estéril à temperatura ambiente para enxágue. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto, sob agitação.

A concentração do hipoclorito de sódio foi de 25 mg/L de cloro residual livre, concentração mínima exigida (BRASIL, 2003). A solução de hipoclorito de sódio foi obtida a partir do produto comercial concentrado p.a. (VETEC), diluído em água destilada estéril, de modo a atingir a concentração de cloro livre, de 25 mg/L. A concentração residual de cloro foi confirmada através da titulação com tiosulfato de sódio (GREENBERG et al., 1985).

O número de *L. monocytogenes* sobre a superfície de todos os cupons antes e depois dos tratamentos foi quantificado, conforme descrito no item 3.1.5, porém nos cupons que passaram pela sanificação com hipoclorito de sódio, foi adicionado 0,1 mL de uma solução 10% de tiosulfato de sódio no tubo contendo 10 mL de Tween 80, para neutralização do cloro.

Cupons apropriados para análise MEV foram retirados antes e após o tratamento CIP, enxaguados com tampão fosfato, fixados em solução Karnovsky modificada e mantidos sob refrigeração para posterior tratamento e análise microscópica (item 3.2.3).

3.5 Análise estatística

A média aritmética e o desvio padrão foram determinados através de uma análise de variância (ANOVA) com o SAS software (2002-2003). Diferenças no número de bactérias em cada tratamento de cada um dos experimentos foram analisadas estatisticamente pelo Teste t-LSD com “significância” expressa ao nível de 95% de confiança ou maior ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tempo ideal de adesão

A população inicial pretendida de 6 log UFC/mL foi atingida após adicionar uma suspensão de 8 log UFC/mL de *L. monocytogenes* em 1.800 mL de leite UHT. Após 6 horas a contagem no leite atingiu 8 log UFC/mL novamente, permanecendo praticamente constante até 12 horas.

O crescimento bacteriano numa cultura pura apresenta normalmente 3 fases distintas. A primeira fase, denominada de fase lag, é caracterizada pelo crescimento lento em virtude da adaptação do microrganismo ao meio de cultura. Esta fase é seguida por uma outra de rápido crescimento exponencial, fase log, na qual a população de bactérias pode atingir 8 log UFC/mL. A fase log é seguida por uma fase estacionária de crescimento (MUIR, 1996).

Após os períodos de 6, 10 e 12 horas de adesão, os cupons foram incubados por 18 horas a 35°C para formação do biofilme. As contagens de *L. monocytogenes* nos biofilmes podem ser observadas na Figura 9.

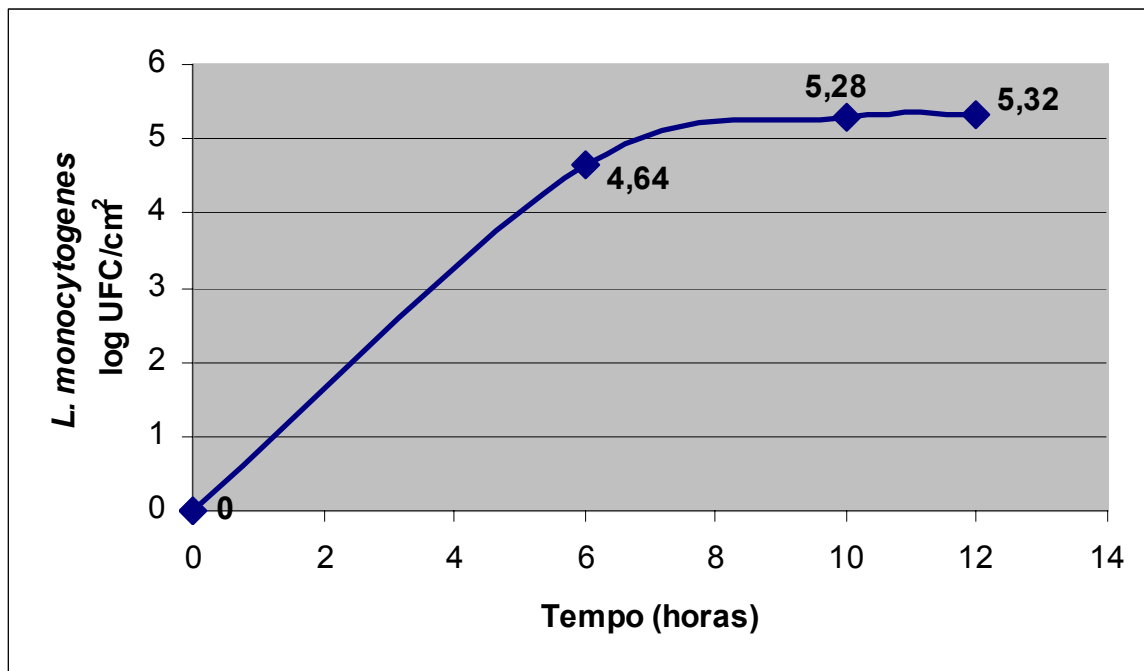


Figura 9 – Contagens de *L. monocytogenes* no biofilme, após diferentes períodos de adesão

Após 6 horas de adesão, o biofilme atingiu uma contagem de 4,64 log UFC/cm² de *L. monocytogenes*, apresentando uma diferença significativa ($p < 0,05$) das contagens após 10 horas (5,28 log UFC/cm²) e 12 horas (5,32 log UFC/cm²). Os tempos 10 e 12 horas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), por isso o tempo de 10 horas foi selecionado para adesão das bactérias nos ensaios seguintes, além de estar mais próximo do utilizado em laticínios, onde corresponde ao tempo máximo de funcionamento em pasteurizadores de leite UHT, sem intervalos de limpeza.

Segundo Zottola (1994), a adesão bacteriana aumenta com o decorrer do tempo de contato. Teoria confirmada neste estudo, onde constatou que o tempo de adesão influencia na formação de biofilme por *L. monocytogenes*, sendo que quanto maior o tempo de contato da superfície com a bactéria, maior o número de bactérias contidas no biofilme, porém com tendência a constância.

Alguns trabalhos também analisaram o processo de adesão em aço inoxidável na presença de leite e encontraram resultados semelhantes. No estudo realizado por Rossi (2008) com *Bacillus cereus*, o tempo de contato de 6 horas resultou em adesão média de 3 log UFC/cm² contra 5 log UFC/cm² após 10 horas. Gândara e Oliveira (2000) observaram que a adesão de *Streptococcus thermophilus*, após 3 horas, foi de 1 log UFC/cm² e após 6 horas de 4 log UFC/cm².

4.2 Formação do biofilme por *L. monocytogenes*

4.2.1 Células planctônicas

O número de células planctônicas de *L. monocytogenes* no leite e no TSB atingiram uma contagem de 8 log UFC/mL quando a 35°C após 10 horas do período de adesão. A 5°C a população de *L. monocytogenes* permaneceu praticamente constante em 6 log UFC/mL durante as 10 horas. Os resultados podem ser observados na Figura 10.

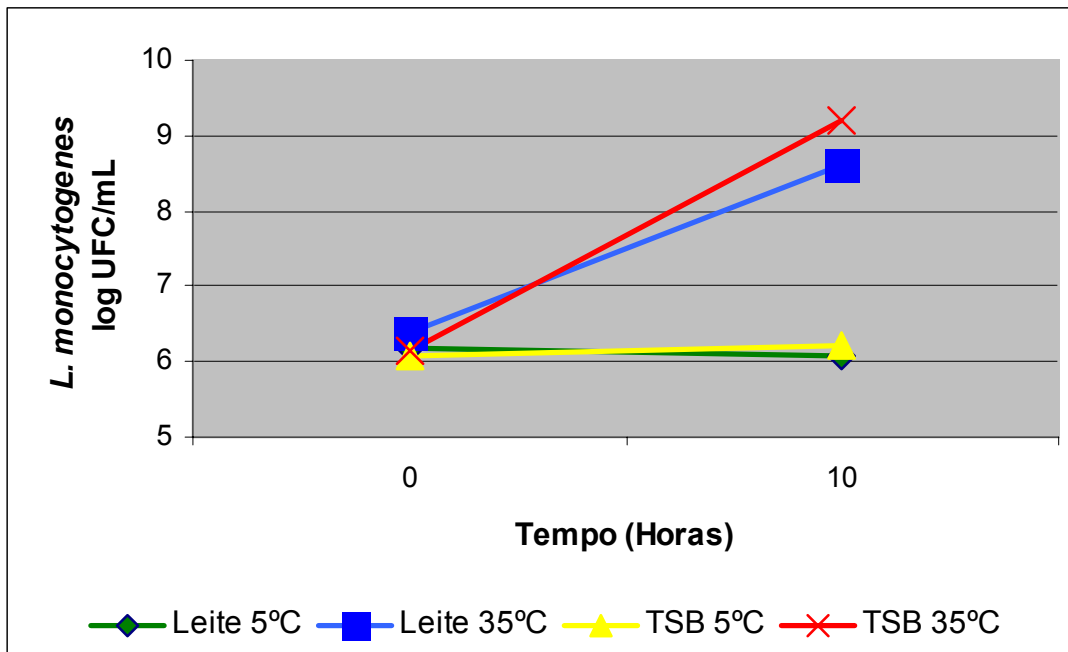


Figura 10 – Perfil de crescimento de *L. monocytogenes* no leite UHT e no TSB-YE a 5 e 35°C

Segundo Franco e Landgraf (2002), o tempo de geração da *L. monocytogenes* varia conforme o meio em que se encontra, sendo que em leite integral é de 0,69 hora a 35°C e de 1,26 a 1,50 dias a 4°C, tal fato, justifica os resultados encontrados no presente estudo, onde a 5°C a *L. monocytogenes* cresceu mais lentamente que a 35°C.

4.2.2 Processo de adesão

Entendendo que a formação de biofilme segue um ciclo, passando por um período inicial de adesão, proliferação das células na superfície do cupom e posterior formação do biofilme, a análise dos resultados deste estudo seguiu esta linha, tendo como variáveis a temperatura e o substrato.

As análises MEV confirmam a influência da temperatura na adesão das células de *L. monocytogenes*. Após 1 e 5 horas de adesão, não foi possível observar células aderidas no cupom, em nenhuma temperatura. Porém, após 10 horas foi possível observar células aderidas na superfície do cupom de aço inoxidável, mas apenas quando a adesão ocorreu a 35°C (Figura 11), sendo que a 5°C não foi observado células aderidas.

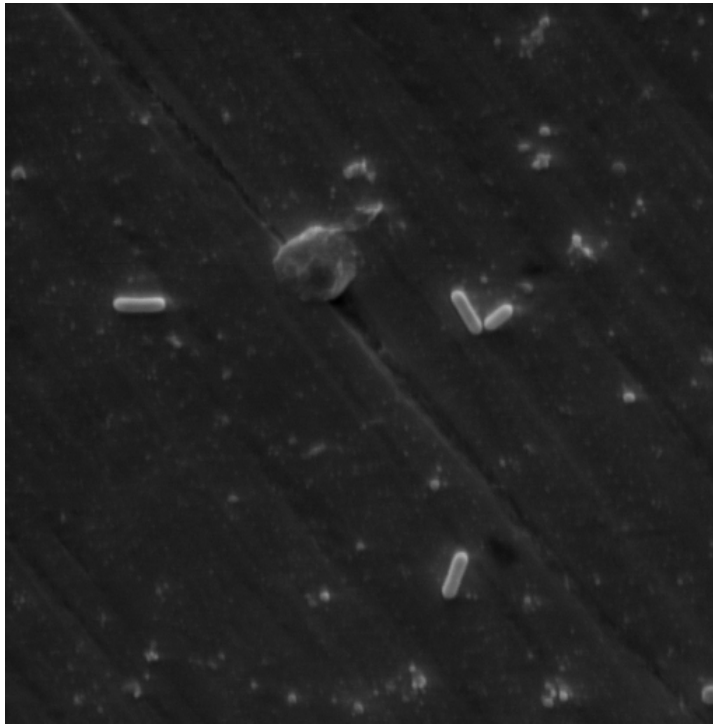


Figura 11 – Cupom de aço inoxidável após 10 horas de adesão da *L. monocytogenes* a 35°C.

Magnitude: 5.000x; 2 cm=2µm

O tempo mínimo requerido para adesão bacteriana é muito relativo, pois vai depender do material, do meio, da temperatura, do microrganismo, entre outras variáveis importantes no processo de adesão. No presente estudo, foi possível observar células aderidas apenas após 10 horas de adesão a 35°C, mas outros estudos com MEV utilizando o mesmo material (aço inoxidável) e o mesmo microrganismo (*L. monocytogenes*) conseguiram visualizar células aderidas após um pequeno tempo de contato, como 20 minutos a 20°C (MAFU et al., 1990), 1 hora a 35°C (MARSH; LUO; WANG, 2003) ou 3 horas a 37°C (RATTI, 2006). A diferença nos resultados é função das diferentes metodologias empregadas para remover as células não aderidas. No presente estudo utilizou-se 10 mL de tampão fosfato, enquanto outros autores apenas imergiram o cupom em 100 mL de TSB (MARSH; LUO; WANG, 2003) ou sequer passaram por esta etapa de remoção das células não aderidas antes da análise MEV (RATTI, 2006).

Beresford, Andrew e Shama (2001) observaram que *L. monocytogenes* aderiram imediatamente nos 17 diferentes materiais testados, entre eles, aço inoxidável. O

processo de adesão ocorreu em TSB a 30°C. As células não aderidas foram removidas com 10 mL de tampão fosfato e as células aderidas foram removidas por sonicação. Depois de um pequeno tempo de contato, as contagens de *L. monocytogenes* atingiram 4 log UFC/cm², passando para 6 log UFC/cm² após 2 horas de contato. Outro estudo realizado por Lundén et al. (2000) também concluíram que células de *L. monocytogenes* em TSB a 25°C aderem em aço inoxidável após 1 e 2 horas de contato atingindo uma contagem de 3 log UFC/cm², e passando para 5 log UFC/cm² após 72 horas de adesão. Os autores removeram as células não aderidas utilizando 50 mL de água e enumeraram as células aderidas através de microscopia epifluorescente. No presente estudo, pode-se afirmar que com 1 e 5 horas de contato não foi possível notar células aderidas, sendo que a análise do período de adesão foi apenas descritiva, através da MEV, e não quantitativa, por isso a comparação entre os resultados torna-se difícil.

Trabalho realizado por Flach (2006) está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, onde após analisar a adesão de microrganismos presentes no leite *in natura* sobre superfícies de aço inoxidável, polipropileno e vidro, observou que o número de microrganismos aderidos foi diretamente proporcional à elevação da temperatura de 10°C para 25°C após 8 horas de contato com o leite *in natura*.

Morton et al. (1998) relatam que independente da espécie ou superfície utilizada, o processo de adesão ocorre a uma intensidade máxima quando os microrganismos são formados a temperatura ótima de crescimento. Isso pode ser confirmado neste estudo, onde o processo de adesão foi maior a 35°C do que a 5°C. Segundo Mafu et al. (1990) a baixas temperaturas o processo de adesão se desenvolve mais lentamente.

4.2.3 Formação do Biofilme

Após o período de adesão, seguiu-se a formação do biofilme sobre os cupons de aço inoxidável. Os biofilmes foram analisados por meio de contagens das células viáveis e por MEV, para um melhor e mais confiável resultado. As contagens das células viáveis quantificam o número de células aderidas no cupom, enquanto na análise microscópica observa-se o biofilme como um todo, qualificando-o, o que é muito importante quando se estuda biofilmes.

As contagens de células de *L. monocytogenes* aderidas no cupom foram realizadas no período inicial (18 horas) e final (114 horas) de formação do biofilme. Os resultados podem ser visualizados na Figura 12 e na Tabela 1.

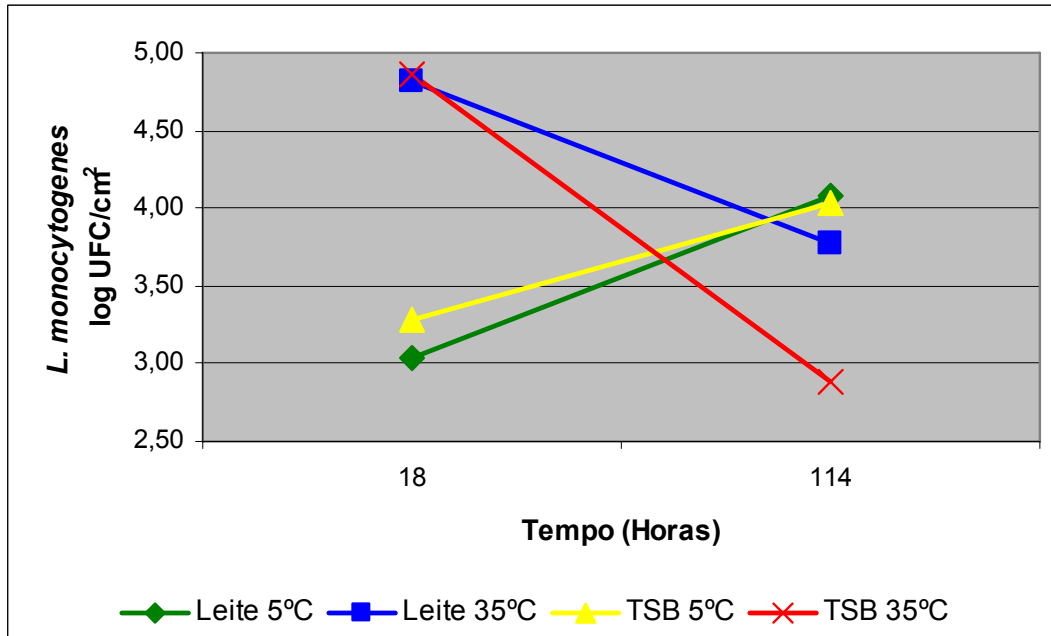


Figura 12 – Perfil de crescimento da população do biofilme de *L. monocytogenes* a 5 e 35°C sobre aço inoxidável

Tabela 1 - Influência da temperatura sobre a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em aço inoxidável

TEMPERATURA (°C)	¹ Contagem de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)			
	18 horas		114 horas	
	Leite	TSB	Leite	TSB
35	4,8123 ^a	4,8564 ^a	3,6821 ^a	2,888 ^a
5	3,0603 ^b	3,2794 ^b	4,1742 ^a	4,0313 ^b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância

Observa-se que com 18 horas de formação do biofilme, a contagem inicial de *L. monocytogenes* nos cupons incubados a 5°C foram significativamente menores do que

nos cupons incubados a 35°C, tanto no leite quanto no TSB. Porém, após 114 horas, houve um aumento na contagem de *L. monocytogenes* nos cupons incubados a 5°C e um decréscimo nos cupons incubados a 35°C, em ambos substratos, mas no caso do leite essa diferença não foi significativa ($p < 0,05$), apenas no TSB.

Chae e Scharaft (2000) constataram que o número de *L. monocytogenes* aderidas sobre o vidro a 37°C começou a diminuir lentamente, passando de 5 log UFC/cm² (48 horas) para 3 log UFC/cm² (72 horas). Ratti (2006) também observou que a máxima adesão de *L. monocytogenes* em aço inoxidável em BHI a 37°C, ocorreu após 24 horas de incubação, em torno de 5 log UFC/cm², havendo uma diminuição de 1 log após 72 horas. Os resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo, onde, após 114 horas a 35°C houve uma redução na contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* em aproximadamente 1 a 2 log UFC/cm², passando de 4,81 log UFC/cm² para 3,68 log UFC/cm² (leite) e de 4,85 log UFC/cm² para 2,88 log UFC/cm² (TSB-YE).

Segundo Chavant et al. (2002), a redução na contagem de *L. monocytogenes* a 35°C pode ser devido ao fato de que a rápida colonização das superfícies a esta temperatura resulta na formação de agregados celulares baseados em um número relativamente baixo de células aderidas, conseqüentemente, esses agregados são volumosos e se desprendem devido às fracas interações das poucas células aderidas com a superfície. Isso fica evidente nas imagens reveladas pelo MEV (Figura 13), onde após 18 horas de formação do biofilme a 35°C (Figura 13b) já é possível observar centenas de bactérias sobre a superfície. Quando os biofilmes são formados a 5°C ocorreu o inverso, ou seja, houve um aumento no número de *L. monocytogenes* aderidas em aproximadamente 1 log UFC/cm², passando de 3,06 log UFC/cm² para 4,17 log UFC/cm² (leite) e de 3,27 log UFC/cm² para 4,03 log UFC/cm² (TSB-YE).

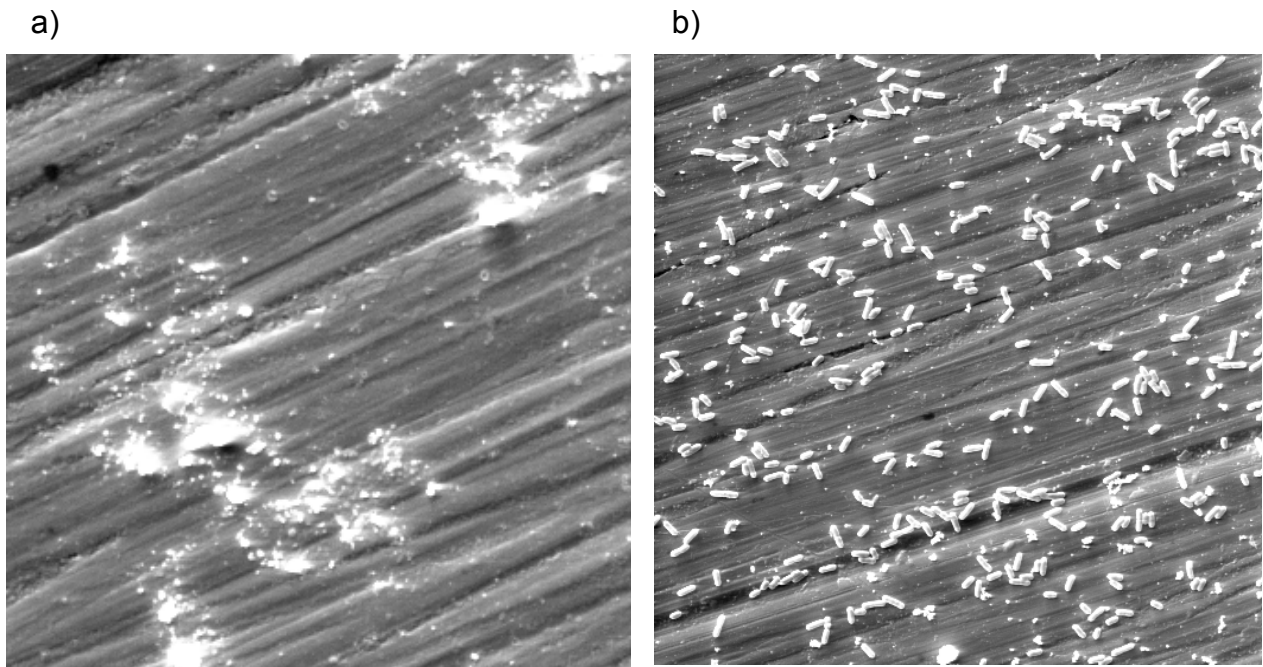


Figura 13 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 5°C (a) e a 35°C (b).

Magnitude: 2.000x; 2 cm=5µm

Após 18 horas a 5°C (Figura 13a) não se observa bactérias isoladas, e sim estruturas que apresentam uma arquitetura porosa, como esponjas, que provavelmente são os materiais polímeros extracelulares (EPS), os quais impedem a visualização das células bacterianas. DiBonaventura et al. (2008) utilizando MEV para analisar *L. monocytogenes* aderidas em aço inoxidável, revelaram que após 24 horas, a 4 e 12°C *L. monocytogenes* produziu um biofilme rudimentar consistindo somente de espaços vazios e poucas células, com uma mínima quantidade de EPS, ao contrário dos biofilmes formados a 22 e 37°C, onde foi possível visualizar muitas células aderidas, assim como no presente estudo.

Após 18 horas a 35°C (Figura 13b) é possível observar muitas células aderidas, umas sobre as outras, porém não foi possível visualizar a formação de polímeros. Outros autores conseguiram observar polímeros após 24 horas de formação do biofilme de *L. monocytogenes* a 22 e 37°C (DiBONAVENTURA et al., 2008), e a 35°C (MARSH; LUO; WANG, 2003). No presente trabalho, mesmo em alta magnificação (10.000 vezes) não foi possível visualizar EPS entre as células a 35°C, como ilustra a Figura 14.

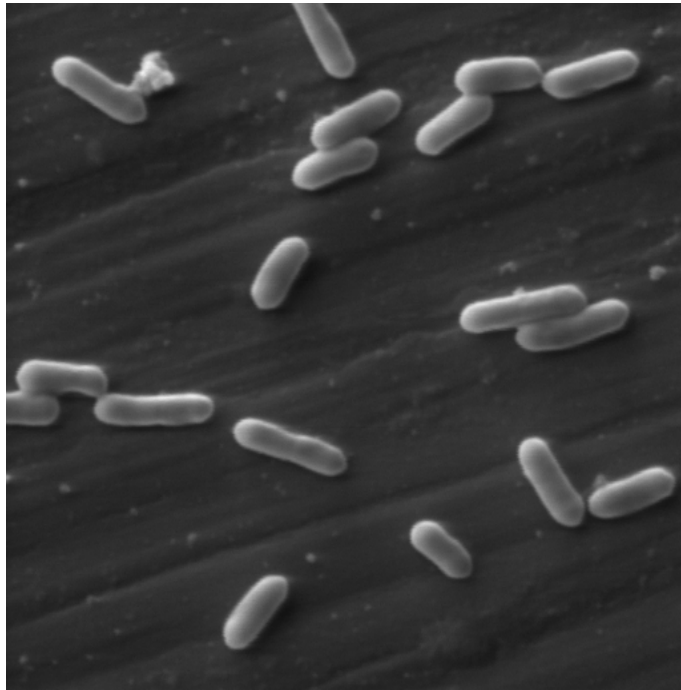


Figura 14 - Biofilme de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 35°C.

Magnitude: 10.000x; 2 cm=1µm

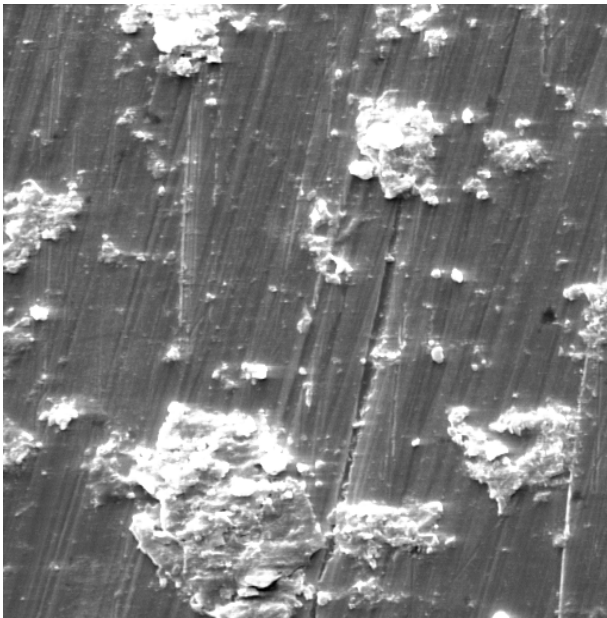
Com os resultados obtidos pelo MEV justificam-se os resultados encontrados nas contagens superiores de *L. monocytogenes* nos biofilmes formados a 5°C, visto que a esta temperatura observa-se a formação de polímeros extracelulares, não observado a 35°C. Segundo Costerton et al. (1995) as bactérias são levadas a produzir mais exopolímeros em condições de estresse, como baixas temperaturas, sendo que esses polissacarídeos extracelulares afetam a adesão e sobrevivência da bactéria, por aumentar o contato com a superfície.

Helke e Wong (1994) inocularam uma suspensão de *Listeria monocytogenes* diluída em leite sobre cupons de aço inoxidável. Após incubação a 32,5 ou 75,5% de Umidade Relativa (UR) e a 6 ou 25°C por 10 dias, concluíram que o frio (6°C) e a UR (75.5%) prolongaram sua sobrevivência. Em ambiente moderadamente frio (10°C), *L. monocytogenes* pode crescer e formar biofilmes sobre aço inoxidável por até 25 dias (JEONG; FRANK, 1994a) ou a 21°C por 10 dias (JEONG; FRANK, 1994b). Oulahal et al. (2008) observaram que a sobrevivência da *Listeria innocua* sobre aço inoxidável após 8 dias, foi significativamente maior a 12°C do que a 25°C. *L. innocua*, assim como

L. monocytogenes é um psicrotrófico e pode crescer a temperatura de refrigeração. Portanto, esses resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo, onde se constatou que o frio prolonga a sobrevivência de *L. monocytogenes* aderidas sobre aço inoxidável. Isso justifica a alta incidência de *L. monocytogenes* em áreas frias da indústria de laticínios, como no trabalho realizado por Nelson (1990), onde analisou 62 laticínios durante 1 ano e observou que áreas frias dos laticínios apresentaram maior incidência de *Listeria* que em outras áreas de processamento.

Na Figura 15 observa-se os biofilmes formados após 42 horas a 5 e 35°C.

a)



b)

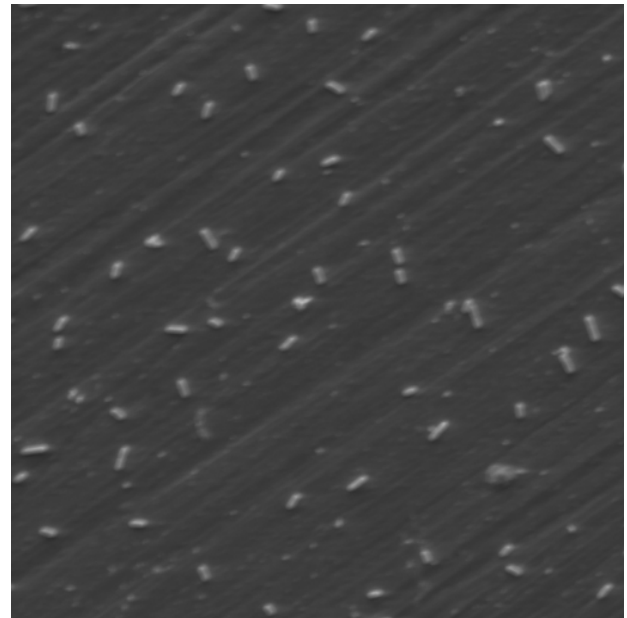


Figura 15 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 42 horas de formação a 5°C (a) e a 35°C (b).

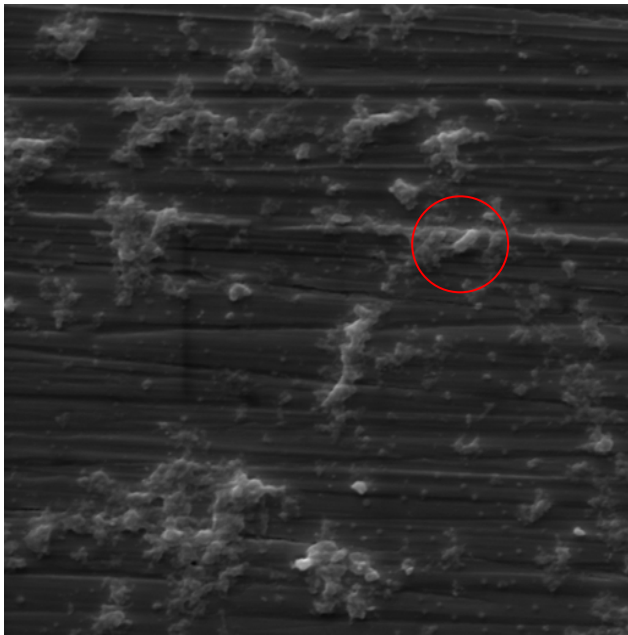
Magnitude: 2.000x; 2 cm=5µm

Após 42 horas de formação, biofilmes formados a 5°C (Figura 15a) exibem uma grande massa de EPS e a 35°C (Figura 15b) uma grande quantidade de células bacterianas, assim como os biofilmes com 18 horas de formação. Como a MEV não é uma análise quantitativa, não é possível afirmar se essa massa aumenta ou diminui, mas pelas contagens o número de células bacterianas a 5°C aumentaram e a 35°C diminuíram com o decorrer do tempo de formação, como visto anteriormente. Rodriguez, Autio e McIandsborough (2008) analisaram biofilmes de *L. monocytogenes* formados em TSB a 32°C usando aço inoxidável através de microscopia de força

atômica, e observaram que após 48 horas colonizaram a superfície formando microcolônias agrupadas medindo 5 a 10 μm de diâmetro, e o número de células aderidas atingiram 7 log UFC/cm².

Na Figura 16 estão ilustrados os biofilmes formados após 66 horas a 5 e 35°C.

a)



b)

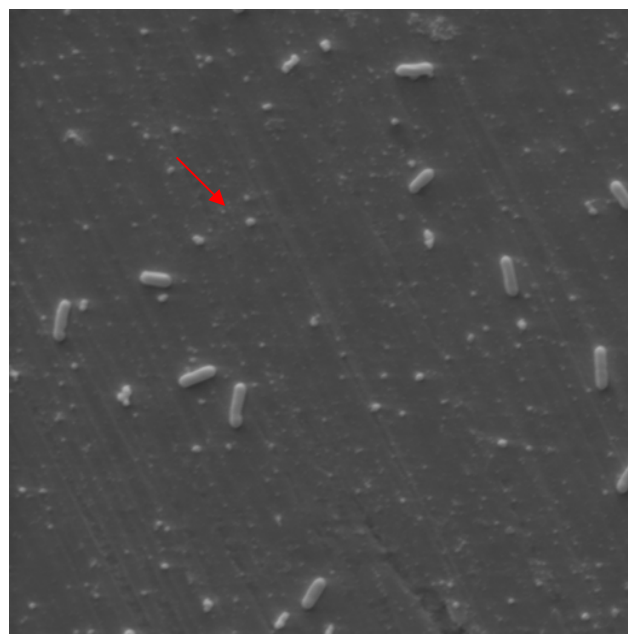


Figura 16 – Biofilmes de *L. monocytogenes* após 66 horas de formação a 5°C (a) e a 35°C (b).
Magnitude: 4.100x; 1,5 cm=2 μm

Após 66 horas de formação do biofilme a 5°C (Figura 16a), o cupom fica praticamente coberto de estruturas porosas, as mesmas observadas após 18 horas de formação, que são provavelmente EPS. Esses EPS são liberados pelas próprias bactérias e dificultam a visualização das mesmas. Na Figura 16a (marcação), foi possível visualizar uma célula bacteriana, mas completamente rodeada de EPS. Já a 35°C (Figura 16b), o cupom é composto por muitas bactérias, e no decorrer do cupom observa-se alguns fragmentos (marcação) que podem ser resíduos bacterianos ou EPS.

Existem várias teorias propostas para descrever as etapas de formação do biofilme e cada autor adota um conceito para determinar o que é ou não biofilme, havendo assim divergências entre os resultados. Assim Kalmokoff et al. (2001) relatam que somente uma cepa de *L. monocytogenes* formou biofilme, enquanto todas as

outras, inclusive “Scott A”, somente aderiam como células isoladas na superfície. Entretanto, Chae e Scharaft (2000) concluíram que todas cepas investigadas, inclusive Scott A, formam biofilmes. A diferença nos resultados está no conceito do que é biofilme, enquanto Kalmokoff et al. (2001) consideraram biofilme apenas as células aderidas com produção de EPS, que foram observadas pelo MEV, Chae e Scharaft (2000) analisaram a formação de biofilme, apenas pela contagem das células viáveis, não levando em consideração a produção de EPS.

Um dos maiores obstáculos quando se estuda adesão bacteriana é determinar como quantificar esses resultados. No presente estudo os biofilmes foram analisados pelas contagens e pela MEV e considerou-se biofilme as bactérias aderidas sobre o cupom juntamente com o substrato, havendo ou não formação de EPS. Tem sido uma dificuldade determinar quais forças ou interações são mais importantes para aderência (HOOD; ZOTTOLA, 1995), mas sabe-se que a adesão bacteriana não depende apenas da produção de EPS, por isso o biofilme pode ser formado pelas bactérias e substrato, como revela as imagens obtidas pelo MEV.

Na Figura 17 estão ilustrados os biofilmes formados após 90 horas a 5 e 35°C.

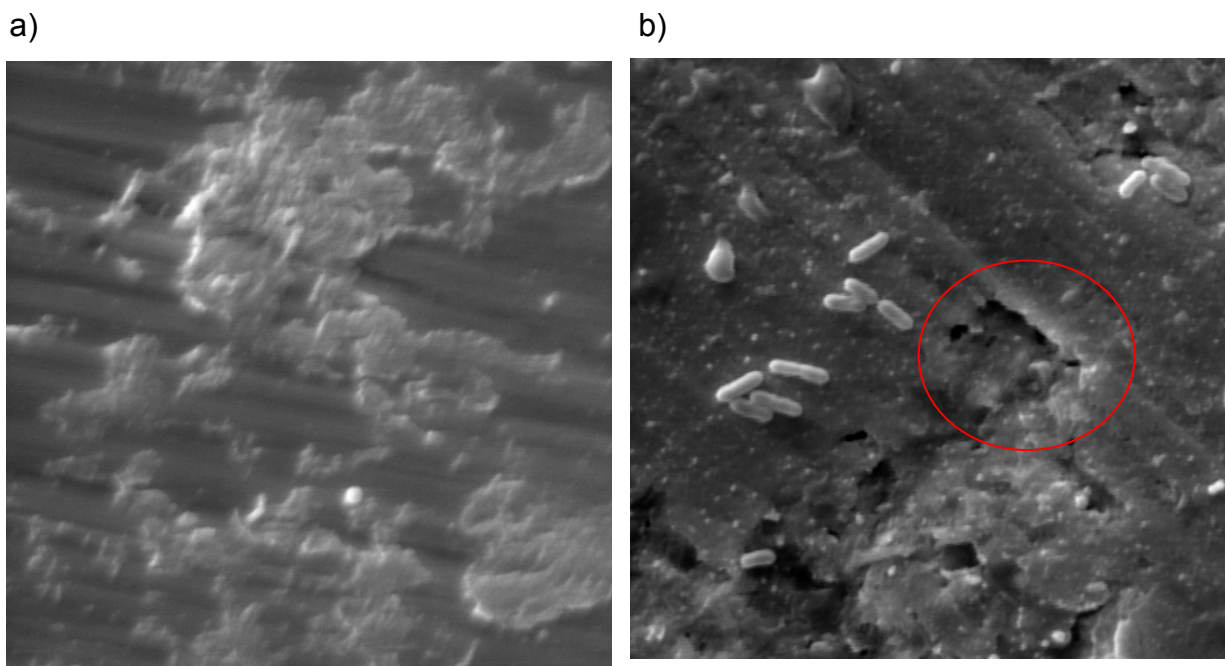


Figura 17 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 90 horas de formação a 5°C (a) e a 35°C (b).

Magnitude: 5.000x; 2 cm=2µm

Após 90 horas a 5°C (Figura 17a) observa-se grande quantidade de EPS em toda a extensão do cupom. A 35°C (Figura 17b) espaços ou canais podem ser observados (marcação), os quais poderiam corresponder a canais de água ou ser consequência dos tratamentos sofridos pela amostra para análise MEV. Outros autores também observaram esses canais ao analisar biofilmes de *L. monocytogenes* em aço inoxidável (CHAVANT et al., 2002; MARSH; LUO; WANG, 2003; MOLTZ; MARTIN, 2005) e chegaram a mesma conclusão. Provavelmente esses canais servem para transportar água, circular nutrientes e oxigênio e facilitar a remoção de excessos (COSTERTON et al., 1995; DONLAN; COSTERTON, 2002). Segundo Surman et al. (1996) o biofilme é composto por 15% do volume de células e 85% de matriz extracelular, sendo esses polímeros extracelulares estruturas muito hidratadas, o processo de desidratação requerido pela MEV prejudica a visualização real da amostra. Por isso, em alguns casos, é possível que se tenha reduções expressivas no volume de alguns componentes hidratados da matriz de EPS e rachaduras provocadas pela desidratação. É preciso levar isso em consideração ao analisar as imagens, portanto não se pode afirmar se os canais observados na Figura (17b) são canais de água ou canais resultantes do tratamento das amostras.

Na Figura 18 estão ilustrados os biofilmes formados após 114 horas a 5 e 35°C.

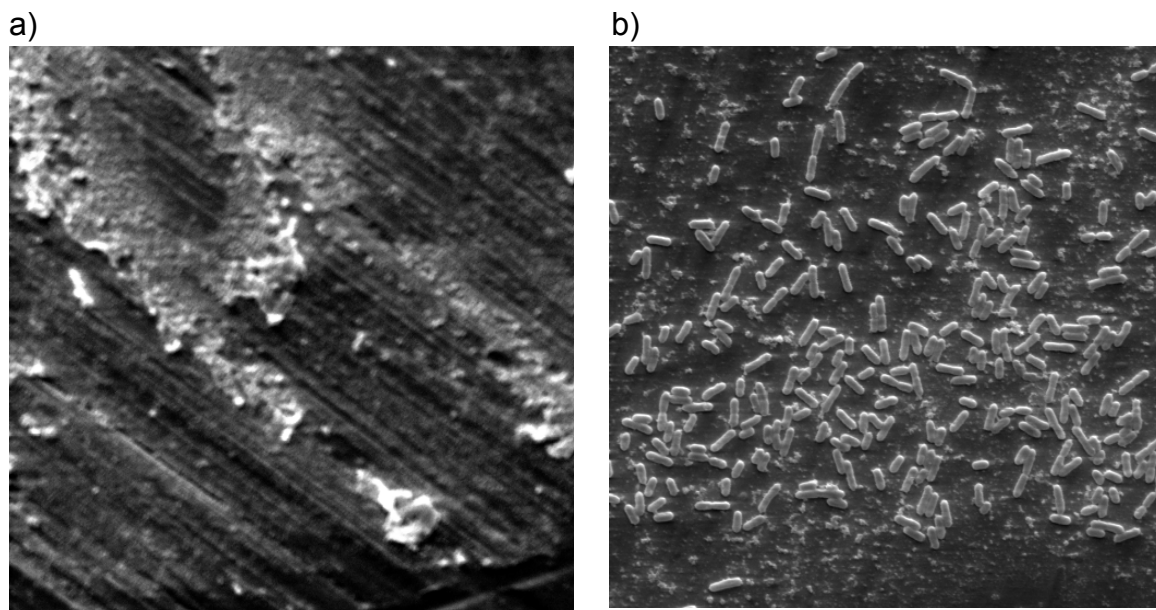


Figura 18 – Biofilmes de *L. monocytogenes* após 114 horas de formação a 5°C (a) e a 35°C (b).

Magnitude: 3.000x; 3 cm=5µm

Após 114 horas a 5°C (Figura 18a), todo o cupom foi coberto por uma massa de EPS, não sendo possível visualizar células isoladas. A 35°C (Figura 18b) observa-se agregados densos de células, umas sobre as outras, e a presença de EPS, como mostrado na Figura 19.

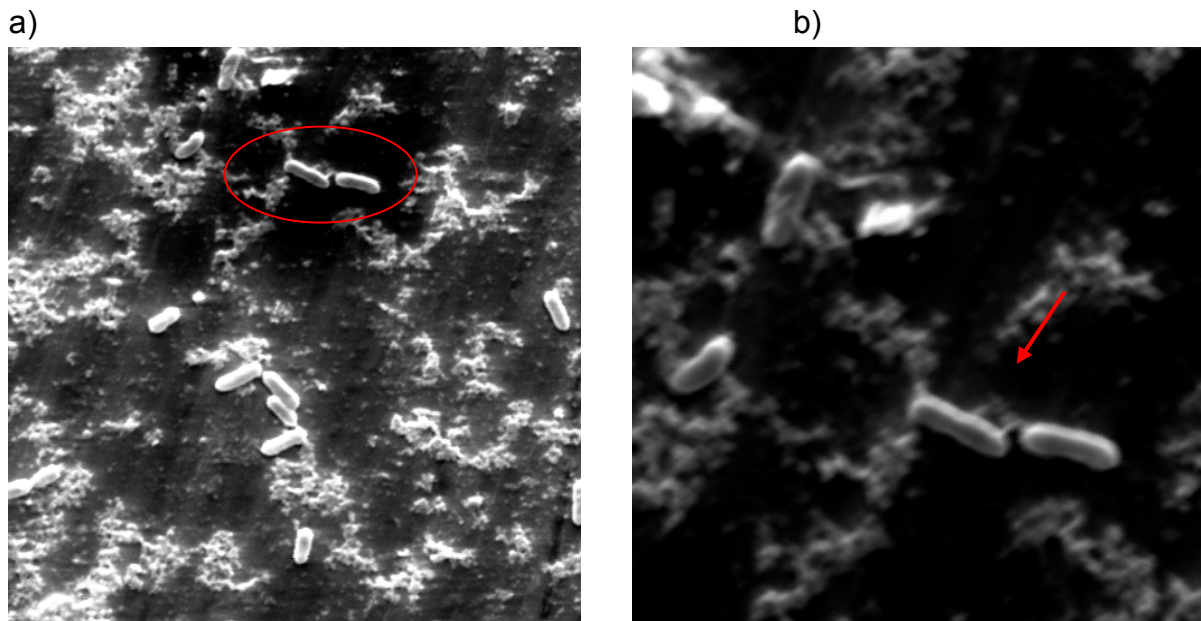


Figura 19 – Formação de EPS após 114 horas de maturação a 35°C (a) e a mesma imagem ampliada (b). Magnitude: (a) 5.000x; 2 cm=2µm; (b) 11.000x; 2 cm=1µm

Marques et al. (2007), observaram que biofilmes de *S. aureus* em aço inoxidável produziram uma considerável quantidade de EPS depois de 15 dias de maturação a 37°C. Em trabalho realizado, Moltz e Martin (2005) também constatou grande quantidade de EPS ao analisar biofilmes de *L. monocytogenes* em aço inoxidável a 20°C após 4 dias. Portanto, assim como encontrado no presente estudo, foi possível visualizar a produção de EPS em biofilmes formados a 5°C, mas quando formados a 35°C os EPS foram visualizados apenas após 114 horas.

Segundo Gandhi e Chikindas (2007) o microrganismo em biofilme é capaz de adaptar-se rapidamente a mudanças de condições ambientais. Provavelmente a baixa temperatura fez com que *L. monocytogenes* produzisse EPS mais rapidamente. Quando a temperatura estava ótima para o crescimento da *L. monocytogenes*, esta foi levada a produzir EPS apenas após 114 horas, provavelmente devido ao estresse

sofrido pela escassez de nutrientes. Rodrigues et al. (2007) encontraram resultados semelhantes analisando formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, onde a escassez de nutrientes provocou um estresse das células e então estas foram levadas a formar biofilmes como mecanismo de sobrevivência.

Apenas a temperatura como medida de controle não garante a total segurança do produto. Os resultados deste estudo confirmam que *L. monocytogenes* pode estar presente no alimento refrigerado ou no ambiente de processamento mantido sob baixas temperaturas, sendo capaz de formar biofilmes na presença de leite e TSB, sobre aço inoxidável, material usado na indústria de alimentos. Esses resultados são importantes para tomada de decisões preventivas, ajudando a identificar os pontos críticos de controle no processo.

4.2.4 Influência do Substrato

Além do tempo de contato, o substrato influencia na formação do biofilme, por isso é importante formar uma superfície de condicionamento no cupom antes do processo de adesão. Os cupons foram condicionados com leite UHT e TSB-YE, e o processo de adesão também ocorreu na presença dos dois substratos.

Surman et al. (1996) relatam que vários fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não só da fisiologia do microrganismo, mas também da natureza do substrato. A presença de resíduos de alimentos pode ser uma importante fonte como um meio para prover a sobrevivência dos microrganismos (KUSUMANINGRUM et al., 2003).

A influência dos dois diferentes substratos na formação do biofilme pode ser analisada através da Tabela 2.

Tabela 2 - Influência do substrato sobre a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em aço inoxidável

SUBSTRATO	¹ Contagem de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)			
	18 horas		114 horas	
	5°C	35°C	5°C	35°C
Leite	3,0603 ^a	4,8123 ^a	4,1743 ^a	3,6821 ^a
TSB	3,2794 ^a	4,8564 ^a	4,0313 ^a	2,8880 ^a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância

Pode-se constatar que ambos os substratos possibilitaram a formação de biofilme por *L. monocytogenes*, não diferindo significativamente entre eles, tanto a 5°C quanto a 35°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Hood e Zottola (1997), onde analisaram a adesão de *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável na presença de TSB, leite desnatado e leite desnatado com 1% de sucrose, e observaram que o meio teve pouca influência na adesão bacteriana.

Helke e Wong (1994) constaram que a presença de componentes do leite como substrato foi favorável para sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes*. Budu-Amoako et al. (1993) demonstraram que a composição do leite não influenciou no crescimento de nenhuma cepa de *Listeria* inoculada em leite durante um período de 14 dias, ao contrário, Speers e Gilmour (1985) constataram que a presença de lactose (4,5%) e proteínas (0,3% de lactoglobulina e 0,07% de α -lactoalbumina) foram mais favoráveis à adesão dos microrganismos do que leite gordo (3,8% de gordura).

Trabalho realizado por Jeong e Frank (1994a) constatou que a disponibilidade de nutrientes influencia na formação de biofilme por *L. monocytogenes*. No presente estudo observa-se que tanto o leite quanto o TSB apresentaram efeito positivo sobre a formação de biofilme por *L. monocytogenes*, não diferindo entre si. Portanto, o ambiente industrial de processamento de alimentos propicia meio adequado para o desenvolvimento desses biofilmes, como ampla distribuição de nutrientes.

4.3 *L. monocytogenes* na presença de *E. coli*

4.3.1 Estudo com as células planctônicas

Pelos resultados obtidos nos testes preliminares, observou-se que a evolução da acidez provocada pela *E. coli* e sua população (UFC/mL) no leite e no TSB não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), portanto optou-se por usar o leite no experimento, por ser um substrato que simula melhor um ambiente industrial de laticínios.

Na Figura 20 observa-se a curva de crescimento da *E. coli* e da *L. monocytogenes* como culturas puras no leite UHT.

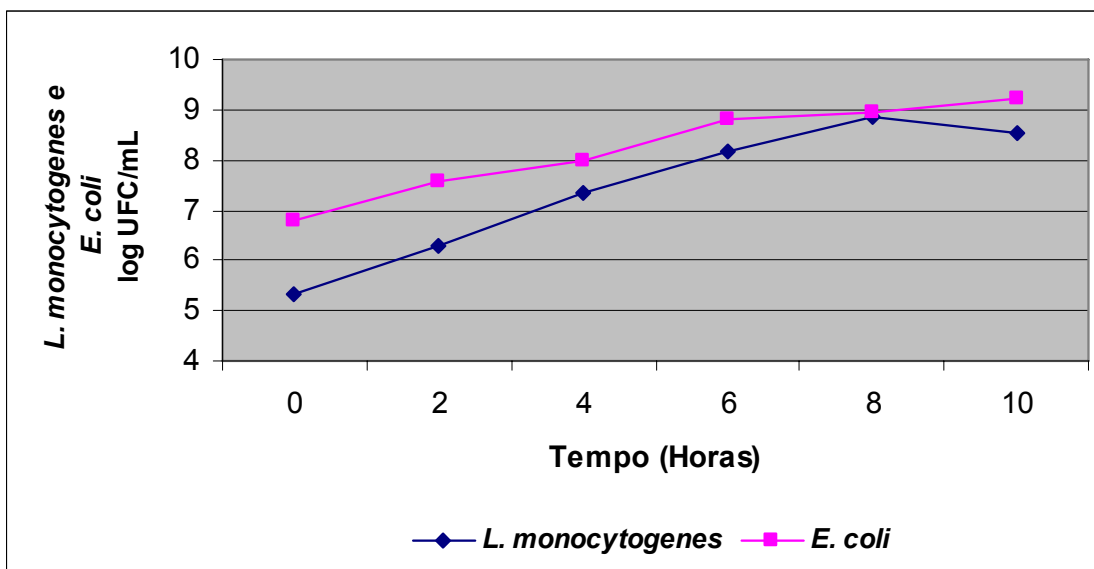


Figura 20 - Perfil de desenvolvimento da *E. coli* e da *L. monocytogenes* em leite UHT

Como pode ser observado (Figura 20), a população de *L. monocytogenes* passou de 5,34 log UFC/mL para 8,54 log UFC/mL, e da *E. coli* passou de 6,78 log UFC/mL para 9,21 log UFC/mL. Portanto, no final do período a *L. monocytogenes* teve um aumento de 3,20 log UFC/mL na sua população, número maior do que a *E. coli*, que foi de 2,43 log UFC/mL, mas isso não representa uma diferença significativa ($p < 0,05$).

A Figura 21 apresenta a evolução do crescimento da *E. coli* e *L. monocytogenes* como culturas mistas. Pontos iniciais (0 horas) e finais (10 horas) da *E. coli* e *L. monocytogenes* como culturas puras (Figura 20) foram sobrepostas no gráfico (Figura 21) para motivos de comparação.

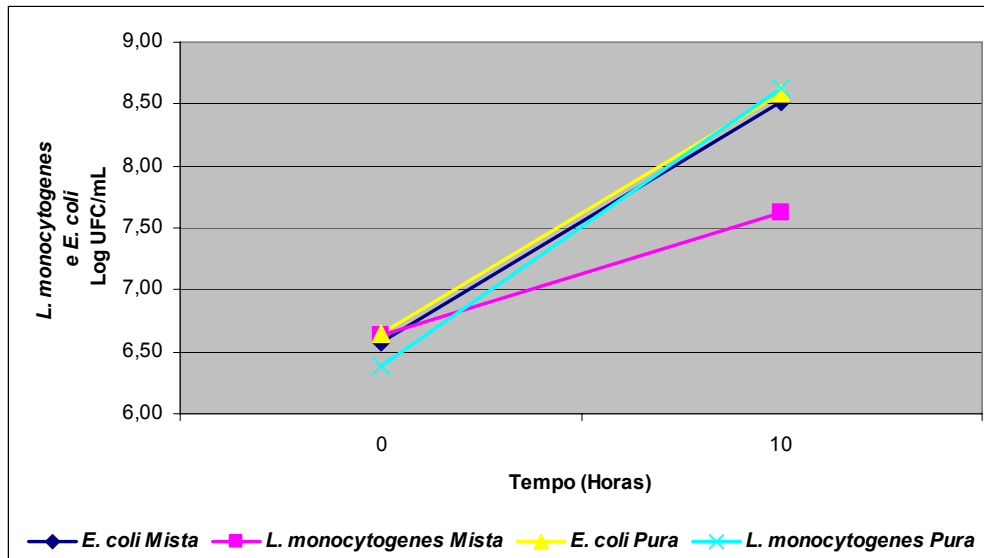


Figura 21 - Perfil de desenvolvimento em leite UHT da *E. coli* e da *L. monocytogenes*, como culturas mistas e puras

A Tabela 3 mostra os resultados da contagens de *L. monocytogenes* e *E. coli* no leite UHT.

Tabela 3 - Influência da *E. coli* no desenvolvimento de *L. monocytogenes* em leite UHT

Culturas	¹ Contagem log UFC/mL	
	0 horas	10 horas
<i>E. coli</i> Pura	6,6532 ^a	8,5813 ^a
<i>E. coli</i> Mista	6,6367 ^a	8,5125 ^a
<i>L. monocytogenes</i> Pura	6,5738 ^a	8,6262 ^a
<i>L. monocytogenes</i> Mista	6,3792 ^a	7,6247 ^b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância.

Com os resultados da Tabela 3 e analisando a Figura 21, constata-se que após 10 horas a 35°C a contagem de *E. coli* não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando em cultura pura ou mista. Já a contagem de *L. monocytogenes* na presença de *E. coli* foi significativamente inferior do que quando estava em cultura pura. Segundo Mellefont, McMeekin e Ross (2008) esse efeito é frequentemente atribuído à produção

de inibidores específicos de crescimento por uma espécie sobre outra. Um determinado microrganismo, ao se multiplicar em um alimento, produz metabólitos que podem afetar a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros microrganismos presentes nesse alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Trabalho realizado por Mellefont, McMeekin e Ross (2008) também analisou a competição entre *L. monocytogenes* e *E. coli*, porém as cepas foram inoculadas em TSB-YE e incubadas sob agitação a 25°C/60h. Os resultados evidenciaram que quando *L. monocytogenes* e *E. coli* foram inoculadas em igual população (6 log UFC/mL), a contagem de *L. monocytogenes* foi menor que a contagem em cultura pura em quase 1 log. Segundo os autores referidos, provavelmente o crescimento da *L. monocytogenes* foi inibido pela combinação de pH e ácidos orgânicos, o que pode justificar os resultados encontrados no presente estudo, onde *E. coli* também inibiu o crescimento da *L. monocytogenes* em 1 log.

Alguns trabalhos estudaram a competição de *L. monocytogenes* em leite com outros microrganismos e encontraram resultados semelhantes ao desse estudo. Budu-Amoako et al. (1993), constataram que na presença de *Yersinia enterocolitica*, o crescimento da *L. monocytogenes* foi inibido no leite integral nas temperaturas de 10 e 22°C após 14 dias de incubação. Interações entre *L. monocytogenes* com *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, contaminantes comuns em leite, foram analisadas (FARRAG; MARTH, 1989; FARRAG; MARTH, 1991). Os microrganismos foram inoculados em igual proporção (5 log UFC/mL) em leite desnatado e permaneceram incubados a 7 ou 13°C por 56 dias. Os autores observaram que as contagens de *L. monocytogenes* diminuíram significativamente em culturas mistas quando comparadas às culturas puras.

Aragon-Alegro et al. (2006) avaliaram o comportamento da *L. monocytogenes* na presença de coliformes. Ambos microrganismos foram inoculados em igual proporção em queijo Minas frescal e, embora tenha sido observada uma certa tendência na inibição de *L. monocytogenes* quando em presença de coliformes, não foi verificada diferença significativa entre populações de *L. monocytogenes* presentes nos queijos produzidos somente com o patógeno e nos produzidos com *L. monocytogenes* e coliformes.

Outros trabalhos analisaram a competição de *L. monocytogenes* inoculadas diretamente em queijo. Chioda et al. (2006) constatou que a adição de ácido láctico e cultura láctica não foram eficazes na eliminação da *L. monocytogenes*, entretanto, o probiótico *Lactobacillus acidophilus* mostrou-se eficiente na eliminação de *L. monocytogenes*. Alexandre et al. (2002) avaliaram a capacidade inibitória de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais produzidos na região do Serro (MG) frente a diversos microrganismos, e concluíram que essas bactérias foram capazes de inibir *L. monocytogenes*.

A medição do desenvolvimento da acidez com culturas mistas foi realizado para verificar se esta variável interferiria no crescimento da *L. monocytogenes*. Observou-se que o leite UHT inoculado com *E. coli* e *L. monocytogenes* apresentou uma acidez inicial de 2,03%, o que corresponde a 18°Dornic (°D). Após 6 horas a acidez subiu para 3,64% (32°D), passando para 3,88% (35°D) após 10 horas. Ou seja, a acidez do leite praticamente dobrou após 10 horas de incubação a 35°C. Essa evolução da acidez provavelmente foi provocada pela *E. coli*, que possui uma fermentação ácida mista, produzindo ácidos e gás (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Segundo Speck (1962) a variação na produção de ácido láctico em leite por culturas lácteas pode resultar na produção de substâncias inibitórias que afetam o crescimento de bactérias psicrótróficas. No caso do presente estudo, a acidez foi provocada pela *E. coli*, e esse o aumento da acidez provavelmente foi o fator que mais influenciou a inibição da *L. monocytogenes* no leite UHT, uma vez que esta bactéria cresce melhor em ambientes neutros.

4.3.2 Estudo do Biofilme de *L. monocytogenes* na presença de *E. coli*

Na Figura 22 e Tabela 4, observa-se os resultados da formação de biofilmes por *L. monocytogenes* e *E. coli* sobre cupons de aço inoxidável após 10 horas de adesão e 18 horas de formação do biofilme a 35°C.

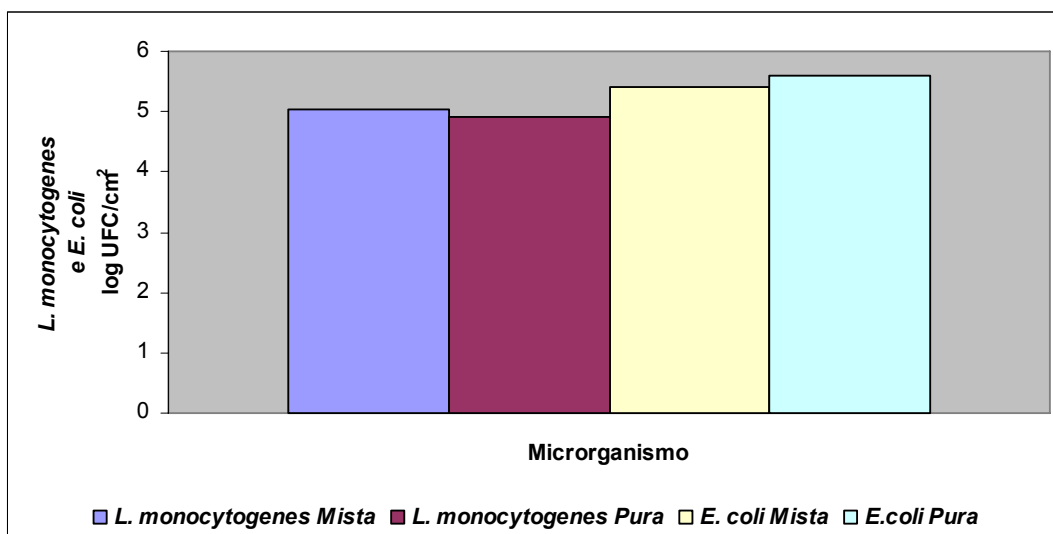


Figura 22 - Formação de Biofilme por *E. coli* e *L. monocytogenes*, como culturas mistas e puras

Tabela 4 - Influência da *E. coli* sobre a formação de biofilme por *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável

Cultura	¹ Contagem log UFC/cm ²
<i>E. coli</i> Pura	5,5960 ^a
<i>E. coli</i> Mista	5,5623 ^a
<i>L. monocytogenes</i> Pura	4,9235 ^a
<i>L. monocytogenes</i> Mista	5,0459 ^a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância

Constata-se então que quando em biofilmes, *L. monocytogenes* não foi inibida pela *E. coli*, diferente dos resultados observados sobre a *L. monocytogenes* na forma planctônica, onde foi inibida. Segundo Hoyle, Jass e Costerton (1990), isso pode ser explicado pelo fato que, em biofilmes, a produção de glicocálix pelas bactérias aderidas podem proteger as células de substâncias inibitórias produzidas por culturas competidoras.

Trabalho realizado em cupons de aço inoxidável incubados por 25 dias a 10°C (JEONG; FRANK, 1994a) e 21°C (JEONG; FRANK, 1994b) usando TSB como meio de cultura, testaram a habilidade da *L. monocytogenes* de formar biofilmes com bactérias competidoras isoladas de indústrias de carne e leite. Os autores observaram que *L.*

monocytogenes foi hábil para sobreviver e crescer em biofilmes preparados com cada uma das 8 culturas isoladas, mas nenhuma cultura era de *E. coli*. Concluíram que a *L. monocytogenes* cresce mais lentamente na presença de uma microbiota competidora, mas em nenhum caso, isolados competidores foram hábeis para excluir completamente a *L. monocytogenes*.

Não foi possível encontrar na literatura relato de outros estudos sobre formação de biofilme em culturas mistas de *L. monocytogenes* e *E. coli*. Entretanto há trabalhos indicando que a associação de *L. monocytogenes* com outros microrganismos pode influenciar ou não a formação de biofilme, dependendo do microrganismo, da metodologia ou do material usado. Alguns trabalhos constataram que a competição favoreceu a formação de biofilme por *L. monocytogenes* (BREMER; MONK; OSBORNE, 2001), outros afirmam que a presença de um competidor inibe a formação do biofilme (ZHAO; DOYLE; ZHAO, 2004; LERICHE; CARPENTIER, 2000), entretanto, no presente estudo, a presença de *E. coli* não influenciou a formação de biofilme por *L. monocytogenes*, nem inibindo, nem aumentando o número de *L. monocytogenes* aderidas na superfície.

Estudo realizado por Ratti (2006) com formação de biofilmes em aço inoxidável com culturas mistas de *L. monocytogenes* e *Leuconostoc mesenteroides* produtor de bacteriocina, concluíram que as cepas de *L. monocytogenes* formaram biofilme após 24 horas de incubação. Quando *L. monocytogenes* foi cultivada com *L. mesenteroides* não produtor de bacteriocina, ocorreu formação de biofilme logo nas primeiras horas de incubação. A presença de bacteriocina desfavoreceu a adesão de *L. monocytogenes* nas primeiras horas de incubação, mas não interferiu na formação de biofilme após 24 horas de incubação. Ao contrário, Zhao, Doyle e Zhao (2004) constataram que *L. lactis* foi excepcionalmente efetivo no controle de *L. monocytogenes* quando em biofilmes por um longo período de tempo a 4°C. Esta cepa é produtora de nisina A e B, a qual é inibitória contra *L. monocytogenes*.

Autores afirmam que a formação de biofilme por *L. monocytogenes* é inibida por *Staphylococcus sciuri* (LERICHE; CARPENTIER, 2000). Segundo os autores, propriedades anti-adesivas do *S. sciuri* podem limitar o número de células aderidas ao substrato. A contradição dos resultados pode ser devido à diferença dos

microrganismos utilizados e a metodologia empregada, onde Leriche e Carpentier (2000) inocularam *L. monocytogenes* diretamente sobre o biofilme de *S. sciuri*, diferente do presente estudo que inoculou *L. monocytogenes* e *E. coli* em igual proporção diretamente no leite, sendo concorrentes na adesão.

Pompermayer e Gaylarde (2000) analisaram a formação de biofilmes por culturas mistas de *E. coli* e *S. aureus* sobre polipropileno a 12°C por 8 horas, e constataram que tanto *E. coli* quanto *S. aureus* aderiram em menor número quando em culturas mistas do que em culturas puras, indicando que existe competição na adesão, que reduz o número de cada espécie aderida à superfície. Diferentes dos resultados encontrados no presente trabalho.

Porém, outros autores (BREMER; MONK; OSBORNE, 2001) encontraram que o número de células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável aumentou significativamente na presença de *Flavobacterium*. Concluíram que a presença de colonizadores primários, como *Flavobacterium*, poderia aumentar o número de células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície, devido à sua incorporação na matriz exopolissacarídica. Este resultado discorda dos encontrados neste trabalho, principalmente pelo fato das diferenças morfológicas entre *E. coli* e *Flavobacterium*, uma vez que a metodologia usada foi bastante semelhante.

Autores afirmam que o grau de aderência da *Pseudomonas* em cupons de aço inoxidável é cerca de 1000 vezes maior que o da *Listeria* (FATEMI; FRANK, 1999), e que a adesão da *E. coli* foi significativamente maior que *S. aureus* (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000). Segundo Speers e Gilmour (1985), a adesão de espécies Gram-negativas foi superior ao de organismos Gram-positivos. No presente estudo *E. coli* (Gram-negativa) e *L. monocytogenes* (Gram-positiva) atingiram contagens semelhantes, aproximadamente 5 log UFC/cm² no biofilme, não diferindo significativamente ($p < 0,05$) quando em cultura pura ou mista. Provavelmente a diferença nos resultados entre os trabalhos está na diferença morfológica dos microrganismos analisados.

Embora as pesquisas focam o estudo de biofilmes na *L. monocytogenes* como cultura pura, na indústria de processamento de alimentos ela normalmente existe como um membro de uma complexa comunidade bacteriana, consistindo de diferentes tipos

de bactérias (DJORDJEVIC; WIEDMANN; McLANDSBOROUGH, 2002). Pelos resultados obtidos, constata-se que *L. monocytogenes* e *E. coli* podem aderir e formar biofilmes sobre superfícies de aço inoxidável, como em placas de pasteurizadores de leite, sendo que em biofilme uma espécie não exerceu influência sobre a outra.

4.4 Avaliação da eficiência do processo CIP

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos após formação do biofilme e após as etapas de limpeza e sanificação.

Tabela 5 - Resultado do processo CIP sobre biofilmes de *L. monocytogenes* formados em aço inoxidável na presença de leite

Etapas	log UFC/cm ²			
	Biofilme de 18 horas		Biofilme de 114 horas	
	5°C	35°C	5°C	35°C
Controle	5,66 ^a	5,00 ^a	5,79 ^a	3,83 ^b
Após Detergentes	< 1	< 1	< 1	< 1
Após Sanificantes	< 1	< 1	< 1	< 1

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância

Como se observa na Tabela 5, após 18 horas de formação do biofilme não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas, porém após 114 horas de formação, o biofilme a 5°C atingiu uma contagem significativamente mais alta de *L. monocytogenes* do que os biofilmes incubados a 35°C. Esse resultado era esperado, devido ao último experimento realizado, como já discutido anteriormente. Entretanto, as condições de formação do biofilme não influenciaram nos resultados do processo CIP, o qual reduziu significativamente a contagem de *L. monocytogenes*, apresentando índices menores que 10 UFC/cm² (limite de detecção do método) em todos os cupons.

Constata-se também que após o tratamento com detergentes a contagem de *L. monocytogenes* no cupom foi menor que 10 UFC/cm². Os detergentes são geralmente formulados para remover proteínas, gorduras, carboidratos ou minerais, e não

microrganismos (GIBSON et al., 1999), no entanto, trabalhos têm mostrado que a etapa de limpeza remove 99,8% (redução de mais de 3 log) de resíduos de leite e bactérias presentes em superfícies de aço inoxidável (DUNSMORE et al., 1981). Segundo Krysinski, Brown e Marchisello (1992) quando a sanificação é precedida pelo tratamento com detergentes, células aderidas de *L. monocytogenes* são inativadas, porém, o sanificante sozinho tem um pequeno efeito, portanto, reportam que, em geral, detergentes são mais efetivos que sanificantes para remover os biofilmes de *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável e plástico. Para um processo de higienização eficiente, é ideal usar detergentes e sanificantes, sendo complementares.

A função de detergentes em remover bactérias da superfície pode ter mais significado na presença de resíduos de alimentos onde os microrganismos podem estar aderidos às partículas (GIBSON et al., 1999), sendo removido juntamente com o alimento. O detergente ácido tem uma ação mais efetiva na remoção de minerais como o cálcio (PASSOS, 1994), isso pode ter contribuído na liberação das células remanescentes ligadas por esse tipo de substância sobre a superfície. No presente estudo, pode-se afirmar que a combinação de detergentes, sanificantes e temperatura foi capaz de eliminar uma população maior que 5 log UFC/cm² de *L. monocytogenes* do biofilme formado sobre aço inoxidável.

Um fator importante que deve ser considerado no presente estudo é a temperatura, na etapa que utiliza detergente alcalino, na qual os cupons permaneceram por 7 minutos a 70°C. Provavelmente a alta temperatura influenciou fortemente na remoção do biofilme das superfícies. Isso pode ser comparado ao trabalho de Lee e Frank (1991), no qual o tratamento com alta temperatura (72°C) resultou na rápida inativação das células de *L. monocytogenes* aderidas em aço inoxidável após 1 minuto de contato. Frank e Koffi (1990) observaram que a temperatura de 70°C por 5 minutos foi suficiente para inativar *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável, mas não sobre vidro, constatando que o aço inoxidável é um bom condutor de calor.

Estudos envolvendo processo de limpeza CIP em ambientes de processamento de leite apresentaram resultados semelhantes ao do presente estudo. Gunduz e Tuncel (2006) distribuíram cupons de aço inoxidável em 7 etapas do processo de produção em uma indústria de sorvetes e concluíram que o processo CIP foi eficiente contra biofilmes

de *L. monocytogenes*, eliminando todas as células presentes. Trabalho semelhante foi realizado por Bremer, Fillery e Mcquillan. (2006), onde expôs tubos de aço inoxidável em leite por 18 horas contendo diversas espécies bacterianas. Após o CIP, utilizando um detergente alcalino (NaOH 1%) e um detergente ácido (Ácido Nítrico), observaram uma redução significativa no número de células, sendo que o detergente ácido teve pouco impacto adicional. Ao contrário, Dunsmore et al. (1981) constataram que produtos ácidos foram mais efetivos que produtos alcalinos.

Estudo realizado no mesmo laboratório e nas mesmas condições do presente estudo, realizado por Rossi (2008), porém analisando biofilmes de *B. cereus*, concluiu que a etapa de limpeza com detergentes reduziu a contagem a poucas células remanescentes (1 a 3 log UFC/cm²), e mesmo após a sanificação com composto quaternário de amônio esses resultados permaneceram inalterados. Portanto, os biofilmes de *B. cereus* aparentemente são de mais difícil remoção que *L. monocytogenes*, que no presente estudo, após a limpeza com detergentes reduziu a uma contagem não detectada pelo método. A efetividade da limpeza sobre a remoção do biofilme depende do microrganismo (HOLAH; BETTS; THORPE, 1989), o que justifica os resultados contrários. Talvez o sanificante pode ter influenciado nos resultados, uma vez que o cloro geralmente remove materiais extracelulares do biofilme melhor que o composto quaternário de amônio (RONNER; WONG, 1993), mas não é possível afirmar, pois após o processo com detergentes o biofilme já atingiu um número menor que 10 UFC/cm².

Mesmo procedimento foi realizado por Gândara e Oliveira (2000) sobre biofilmes de *Streptococcus thermophilus*, e observaram que a limpeza e sanificação mostraram-se eficientes na redução para níveis não detectáveis na contagem de *S. thermophilus*. Dufour, Simmonds e Bremer (2004) também usaram o mesmo processo CIP sobre biofilmes de *Bacillus (flavothermus, subtilis, licheniformis)* e *S. thermophilus* e concluíram que ambos microrganismos formaram biofilmes atingindo uma contagem de 5 log UFC/cm², e este número de células foi reduzido para 2,6 log UFC/cm² após NaOH, passando para 0,7 log UFC/cm² após ácido nítrico, e não alterando os resultados após a sanificação com cloro (200 mg/L). Os resultados estão de acordo

com o presente estudo, onde o número de células viáveis foi menor que 10 log UFC/cm², número não detectado pelo método suabe.

Além do leite, estudos foram realizados utilizando outros substratos para avaliar a eficiência do processo de limpeza sobre biofilmes de *L. monocytogenes* em aço inoxidável. No estudo de Gram et al. (2007), cupons de aço inoxidável foram imersos em caldo de salmão ou caldo de carne, adicionados de uma suspensão de 6 log UFC/mL de *L. monocytogenes* e permaneceram a 20 ou 30°C por um período de 7 dias. Assim como no presente estudo, observaram que o número de bactérias aderidas sobre a superfície antes da limpeza variou de 4 a 6 log UFC/cm², mas após a limpeza todas as bactérias aderidas foram removidas.

Alguns trabalhos analisam a eficácia de diferentes sanificantes frente a biofilmes de *L. monocytogenes*. Folsom e Frank (2006) analisaram o efeito do hipoclorito de sódio sobre biofilmes de *L. monocytogenes*. Biofilmes com contagens de 5 a 6 log UFC/cm² de *L. monocytogenes* foram removidos após passarem pela sanificação com solução de cloro (100g/L) por 5 minutos sob agitação. Mesmo resultado foi encontrado por Ronner e Wong (1993), onde após o processo de sanificação sobre biofilmes de *L. monocytogenes* em aço inoxidável a população foi reduzida de 3-5 log UFC/cm² por todos os sanificantes testados (CQA, iodo, cloro e ácido aniônico).

Apesar das análises não revelarem a presença de *L. monocytogenes*, pode-se observar através das análises MEV que ainda restam células remanescentes, como ilustrado na Figuras 23.

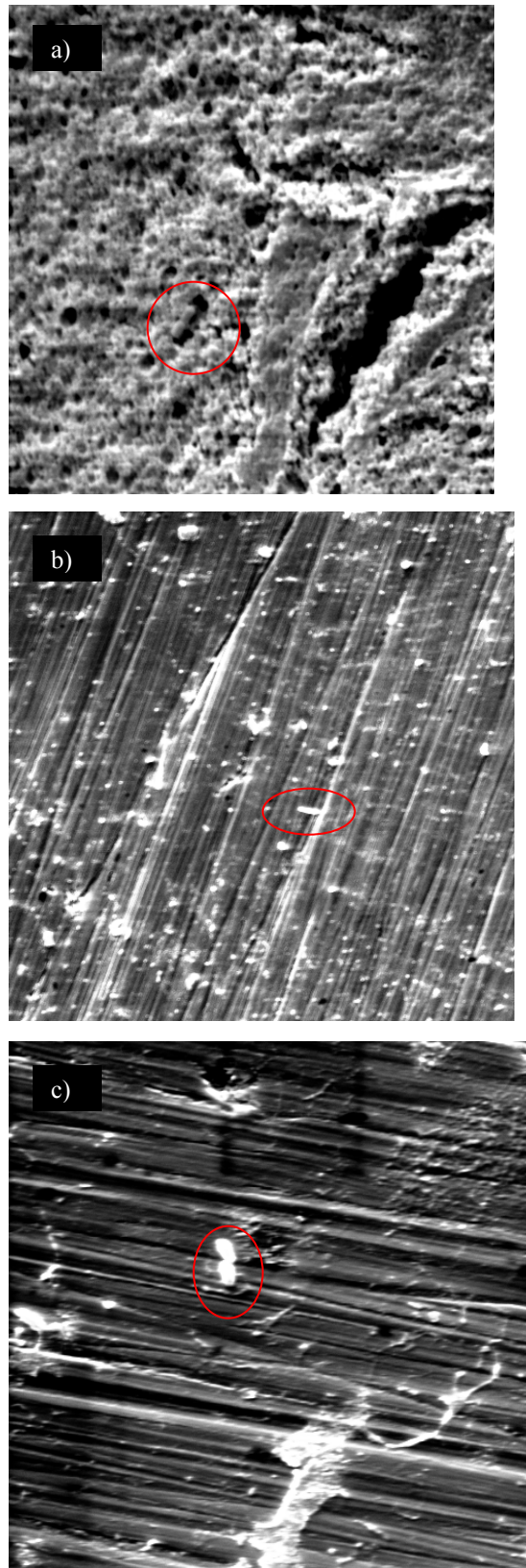


Figura 23 - Formação do Biofilme de *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável avaliada através do MEV, antes de passar pelo processo CIP (a), após passar pelos detergentes (b) e após passar pelo processo completo, detergentes e sanificantes (c). Magnitude: 5.000x; 2 cm=2 μ m

Nos cupons que não sofreram tratamento de limpeza CIP (Figura 23a), a presença de resíduo de leite dificultou a visualização das células de *L. monocytogenes*, mas foi possível visualizar algumas células sob a camada de leite (marcação). Após o processo de limpeza CIP (Figura 23b e c) foi possível observar a presença de alguns resíduos, inclusive de algumas células remanescentes (marcação).

A diferença nos resultados de contagem e microscopia pode ser justificada de duas formas. Uma são as limitações no uso da técnica de remoção por suabe. Por esta técnica, no caso da presença de poucas bactérias sobre a superfície, pode ser impossível a detecção das células remanescentes (GRAM et al., 2007; FOLSOM; FRANK, 2006; HOOD; ZOTTOLA, 1995; WONG, 1998). Pap e Kiskó (2008) testando a eficácia de sanificantes sobre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* concluíram que pelo método de impedância, foi possível detectar uma única célula sobrevivente, o que não foi possível pela técnica convencional de plaqueamento. No presente estudo, considerando-se que o número de células remanescentes foi reduzido para menor que 10 UFC/cm², provavelmente, o método de remoção por suabe não foi capaz de recuperar essas poucas células, mas estas puderam ser detectadas pelas imagens MEV.

Outra justificativa seria a possível presença de organismos não viáveis na superfície do cupom. Um obstáculo da MEV é esse, onde é impossível identificar as células vivas e mortas. Alguns estudos observaram os mesmo resultados. Walton et al. (2008) investigaram a influência de detergentes sobre biofilmes de *L. monocytogenes* em aço inoxidável e observaram que, após tratamento com detergentes, houve uma redução no número de células viáveis de *L. monocytogenes*, atribuída ao efeito bactericida e não à remoção das células da superfície. Resultados semelhantes foram encontrados por Ronner e Wong (1993) que observaram, por MEV, que células de *L. monocytogenes* permanecem sobre os cupons depois do tratamento com sanificantes, mas são células não viáveis. Stone e Zottola (1985) também analisaram o processo CIP contra *Pseudomonas fragi* aderidas e análises MEV revelaram células remanescentes sobre a superfície após o processo CIP, mas na contagem células viáveis não foram detectadas. Portanto, pode ser que as células de *L. monocytogenes* observadas na MEV são células não viáveis, mas que ainda continuam na superfície do aço inoxidável.

Mesmo concluindo que restam algumas células de *L. monocytogenes* na superfície do cupom, com os resultados obtidos nas contagens, constatou-se que o processo CIP foi capaz de reduzir uma população de *L. monocytogenes* em um número maior do que $5 \log \text{ UFC/cm}^2$, o que torna o processo seguro em um laticínio. Portanto, o processo CIP é um meio adequado de remover biofilmes de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável, desde que seja realizado adequadamente, com soluções, concentrações e tempos de contato corretos, além disso, deve ser realizado com frequência, antes e após o processamento. Limpeza e sanificação adequada são ainda a melhor forma de evitar uma contaminação.

4.5 Superfície de aço inoxidável

Com o intuito de analisar a superfície do aço inoxidável, sem a presença de *L. monocytogenes*, um cupom controle que foi limpo e autoclavado foi analisado através da MEV e pode ser visualizado na Figura 24.

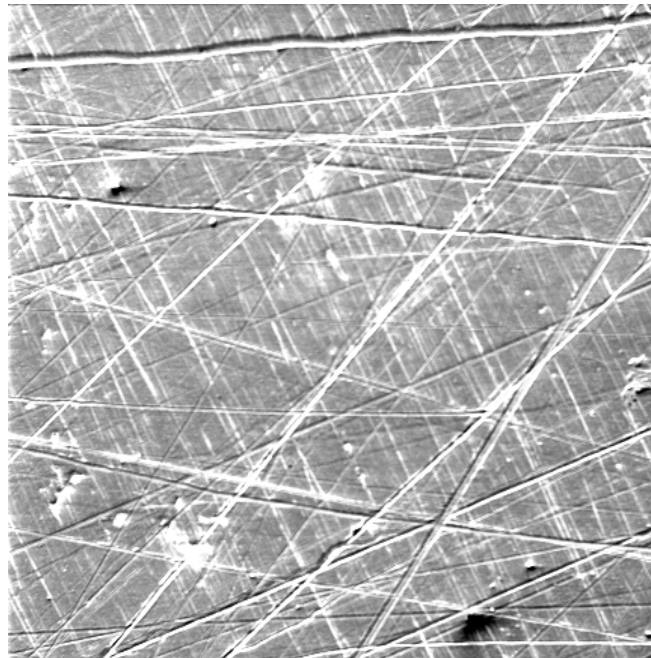


Figura 24 - Cupom Controle

Na Figura 24 pode-se observar a presença de resíduos no cupom, mesmo após passar por todo o processo de higienização e esterilização, além de apresentar uma

superfície bastante irregular, com rachaduras e ranhuras, as quais são bastante convenientes para a aderência de células de *L. monocytogenes*. Mesmo resultado foi encontrado por Flach (2006) e Mafu et al. (1990), onde notaram que o aço inoxidável apresentou diversas deformidades, não percebidas macroscopicamente, mas capazes de permitir a adesão de alguns microrganismos.

Superfície que apresente irregularidade tal como ranhuras, cavidades, granulidades, aumentam a aderência bacteriana tanto por facilitar a fixação das células como por dificultar a sua remoção pelos processos de limpeza (ARCURI, 2000). A presença de micro fendas pode abrigar e proteger microrganismos dos tratamentos de limpeza (STONE; ZOTTOLA, 1985).

A superfície de aço inoxidável, mesmo tendo acabamento com polimento sanitário 304, apresentou uma superfície bastante irregular. Essas imperfeições podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização favorecendo a adesão de microrganismos. Além disso, na prática existem válvulas, fissuras, quinas que também dificultam o processo de higienização.

5 CONCLUSÕES

A formação de biofilme de *L. monocytogenes* foi significativamente influenciada pela temperatura, onde a temperatura de 5°C prolongou sua sobrevivência sobre aço inoxidável, provavelmente pela formação de polímeros extracelulares, produzidos em maior número a esta temperatura, como observado pelas imagens obtidas pela MEV.

Tanto o leite quanto o TSB foram favoráveis para adesão e formação de biofilme pela *L. monocytogenes*.

A presença de *E. coli* não influenciou na formação de biofilmes pela *L. monocytogenes*.

Em todas as condições estudadas, o processo de limpeza CIP foi eficiente para remover as células de *L. monocytogenes* a níveis não detectados pelo método suabe ou tornando essas células inviáveis.

REFERÊNCIAS

- AARNISALO, K.; SALO, S.; MIETTINEN, H.; SUIHKO, M. L.; WIRTANEN, G.; AUTIO, T. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. **Journal of Food Safety**, Westport, v.20, p.237–250, 2000.
- ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácteas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.4, p. 424-428, jul./ago. 2002.
- ALVES, E. **Introdução a microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43 p.
- ANDRADE, N.J. de. **Higienização na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412 p.
- ANWAR, H.; STRAP, J. L.; CHEN, K.; COSTERTON, J.W. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.36, n.6, p.1208–1214, June 1992. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/reprint/36/6/1208>>. Acesso em: 10 abr. 2009.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; NODA, P.K.; HOROTA, D.M.; MARTINS, C.G.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Influência de coliformes na população de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20., 2006, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: SBCTA, 2006. p.355.
- ARCURI, E.F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 53, p.40-45, jul./ago. 2000.
- BECKERS, H.J.; SOENTORO, P.S.S.; DELFGOU-VAN ASCH, E.H.M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw Milk and itis resistance to heat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.4, p.249-256, 1987.
- BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, p.1000-1005, 2001.
- BEST, M., KENNEDY, M. E., COATES, F. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.56, n.2, p.377–380, Feb. 1990.

BILLE, J.; BLANC, D.S.; SCHMID, H.; BOUBAKER, K.; BAUMGARTNER, A.; SIEGRIST, H.H.; TRITTEN, M.L.; LIENHARD, R.; BERNER, D.; ANDERAU, R.; TREBOUX, M.; DUCOMMUN, J.M.; MALINVERNI, R.; GENNÉ, D.; ERARD, P.H.; WAESPI, U. Outbreak of human listeriosis associated with tome cheese in northwest Switzerland, 2005. **Euro Surveill**, v.11, n.6, p.91-93, 2006. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/em/v11n06/1106-226.asp>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

BINNING, G., QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, Woodbury, v.56, p.930-933, 1986.

BLACKMAN, I.C.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.8, p.827-831, 1996.

BORUCKI, M.K.; PEPPIN, J.D.; WHITE, D.; LOGE, F.; CALL, D.R. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, p.7336-7342, 2003.

BOWER, C.K.; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces – a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 71, p.152-157, May. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 22 jan. 2008.

_____. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 2535, de 24 de outubro de 2003 do município de São Paulo. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

BREMER, P.J.; MONK, I.; OSBORNE, C.M. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to Stainless Steel Surface in the presence or absence of *Flavobacterium* ssp. **Journal of Food Protection**, Ames, v.64, n.9, p.1369-1376, 2001.

BREMER, P.J.; MONK, I.; BUTLER, R. Inactivation of *Listeria monocytogenes/Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.321-325, 2002.

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

BUDU-AMOAKO, E.; TOORA, S.; ABLETT, R.F.; SMITH, J. Competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.6, p.528-532, June 1993.

BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology**, v.46, p.165-173, 1987.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, set./dez. 2001.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.62, n.1-2, p.103-111, Dec., 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T7K-41S4TT4-D8&_cdi=5061&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=12%2F05%2F2000&_sk=999379998&view=c&wchp=dGLzVzz-zSkzV&md5=78da531edb7c9cb0134a44a529633161&ie=/sdarticle.pdf> Acesso em: 15 jan. 2009.

CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.; HEBRAUD, M. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n.2, p.729-737, Feb. 2002.

CHARACKLI, W. G.; COOKSEY, K. E., Biofilm and microbial fouling. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v.29, p.93-137, 1983.

CHIODA, T.M.; SHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; MACRI, S.F.; TROVO, K.P.; MEDEIROS, A.A. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.101, p.121-124, 2006.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.2, n.1, p. 22-32, 2003. Disponível em: < <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118855907/PDFSTART>>. Acesso em: 12 abr. 2009.

COSTA, E. T. R., **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

COSTERTON, J. W., CHENG, K. G., GEESSEY, K. G., LADD, P. I., NICKEL, J. C., DASCUPHAM, M., MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.41, p.435-464, Oct., 1987. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>>. Acesso em: 12 abr. 2009.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R., LAPPIN SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.49, p.711–745, 1995.

DAGOSTINO, L.; GOODMAN, A. E.; MARSHALL, K. C. Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. **Biofouling**, Chur, v.4, n.1-3, p.113–119, Aug. 1991.
Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/content~content=a907585393~db=all~order=page>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

DHALIWAL, D.S.; CORDIER, J.L.; COX, L.J. Impedimetric evaluation of the efficiency of disinfectants against biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, p.217-221, 1992.

DIBONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; LANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p.1552-1561, 2008.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; McLANDSBOROUGH, L.A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n.6, p.2950-2958, June 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/68/6/2950>>. Acesso em: 12 out. 2008.

DONLAN, M.R; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.15, n.2, p. 167-193, Apr. 2002.

DONNELLY, C.W. Detection and Isolation of *Listeria monocytogenes* from Food Samples: Implications of Sublethal Injury. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.85, n.2, p.495-500, 2002.

DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E.H.; DONNELLY, L.S. Comparasion of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.1, p.14-17, Jan. 1987.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p.

DRIESSEN, F.M.; VRIES, J; KINGMA, F. Adhesion and growth of thermoresistent *streptococci* on stainless steel during heat treatment of milk. **Journal Food Protection**, Ames, v. 47, n. 11, p. 848-852, Nov. 1984.

DUFOUR, M.; SIMMONDS, R.S.; BREMER, P.J. Development of a Laboratory scale Clean-In-Place system to test the effectiveness of “Natural” antimicrobials against dairy biofilms. **Journal of Food Protection**, Ames, v.67, n.7, p.1438–1443, 2004.

DUNSMORE, D.G.; TWOMEY, A.; WHITTLESTONE, W.G.; MORGAN, H.W. Design and performance of systems for cleaning product contact surfaces of food equipment: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.44, p.220-240, 1981.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *L. monocytogenes*: a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v.55, p.476-511, 1991.

FARBER, J.M.; DALEY, E.; COATES, F.; EMMONS, D.B.; McKELLAR, R. Factors influencing survival of *Listeria monocytogenes* in milk in a High-Temperature Short-Time Pasteurizer. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, n.12, p.946-951, Dec. 1992.

FARRAG, S.A.; MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* at 7 or 13°C in skim milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.12, p.852-855, Dec. 1989.

FARRAG, S.A.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of Flavobacteria in skim milk at 7 or 13°C. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.9, p.677-680, Sept. 1991.

FATEMI, P.; FRANK, J.F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/ *Pseudomonas* Biofilms by Peracid Sanitizers. **Journal of Food Protection**, Ames, v.62, n.7, p.761–765, 1999.

FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, n.6, p.641-650, Dec. 1996.

FLACH, J. **Formação de Biofilmes em diferentes materiais utilizados na indústria de processamento de leite**. 2006. 115 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FLINT, S.H.; BREMER, P.J.; BROOKS, J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant - description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, Chur, v.11, n.1, p.81-97, Feb. 1997. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/content~content=a907580812~db=all~order=page>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

FOLSOM, J.P.; FRANK, J.F. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, n. 6, p.1292-1296, 2006.

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

FRANK, J.F.; CHMIELEWSKI, R.A.N. Effectiveness of Sanitation with Quaternary Ammonium Compound or Chlorine on Stainless Steel and Other Domestic Food-Preparation Surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n.1, p.43-47, 1997.

FRANK, J.F.; GILLET, R.A.N.; WARE, G.O. Association of *Listeria* ssp. contamination in the dairy processing plant environment with the presence of *staphylococci*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.11, p.928-932, 1990.

FRANK, J.F.; KOFFI, R. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* in associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 7, p. 550-554, July 1990.

GÂNDARA, A.L.N.; OLIVEIRA, J.S.de. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n.1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612000000100001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 21 Fev. 2008.

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

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

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

GREENBERG, A.E.; TRUSSELL, R.R.; CLESCERI, L.S.; FRANSON, M.A.H. **Standard methods for the examination of water and wasterwater**. Washignton, D.C.: APHA, 1985. 1928 p.

GUNDUZ, G.T.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.89, p.329-336, 2006.

HELKE, D. M.; WONG, A.C.L. Survival and Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-N Rubber. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.11, p.963-968, 1994.

HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.5, p.1549–1552, Sept. 1988. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/119450397/abstract>>. Acesso em: 11 abr. 2009.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.35, p.199-202, Apr. 2003.

HOLAH, J.T.; BETTS, R.P.; THORPE, R.H. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene. **International Biodeterioration**, Birmingham, v.25, n.1-3, p.147-153, 1989. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tockey=%23TOC%2311507%231989%23999749998%23364362%23FLP%23&_cdi=11507&_pubType=J&_auth=y&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=d801b652d627d08538897ce9c8d831f8>. Acesso em: 11 abr. 2009.

HOLAH, J.T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.11, n.5, p.255-259, Nov. 1990. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119377645/PDFSTART>>. Acesso em: 11 abr. 2009.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing – review. **Food Control**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.

_____. Growth Media and Surface Conditioning Influence the Adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* Cells to Stainless Steel. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n.9, p. 1034-1037, 1997.

HOYLE, B.D.; JASS, J.; COSTERTON, J.W. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.26, p.1-6, July 1990. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/reprint/26/1/1?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=hoyle&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&volume=26&resourcetype=HWCIT>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

JEONG, D.K.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, p.576–586, 1994a.

_____. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21°C in Biofilms with Micro-organisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.27, n.5, p.415-424, Oct. 1994b.

JOHANSEN, C.; FALHOLT, P.; GRAM, L. Enzymatic Removal and Disinfection of Bacterial Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, n.9, p.3724–3728, Sept. 1997.

KABUKI, D.Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo frescal tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular.** Campinas, 2004. 145p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

KALMOKOFF, M.L., AUSTIN, J.W., WAN, X.D., SANDERS, G., BANERJEE, S., FARBER, J.M. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, p.725-734, 2001.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, n.11, p. 1811-1829, 2002.

KRYSINSKI, E.P.; BROWN, L.J.; MARCHISELLO, T.J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.4, p. 246-251, Apr. 1992.

KUMAR, C.G., ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.42, p.9–27, 1998.

KUSUMANINGRUM, H.D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.85, p.227-236, 2003.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M.S.; HEIR, E.; HOLCK, A.L. Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, v. 51, n.4, p.283-290, 2003.

LeCHEVALIER, M.W.; CAWTHON, C.D.; LEE, R.G. Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.53, n.3, p.649-654, Mar. 1988. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/54/3/649>>. Acesso em: 12 jul. 2008.

LEE, S.; FRANK, J.F. Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* using hypochlorite and heat. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.1, p.4–10, Jan. 1991.

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

LEWIS, S.J.; GILMOUR, A.; FRASER, T.W.; MCCALL, R.D. Scanning electron microscopy of soiled stainless steel inoculated with single bacterial cells. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.4, n.4, p. 279-284, Aug. 1987. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T7K-476FFDD-1M-1&_cdi=5061&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=08%2F31%2F1987&_sk=999959995&view=c&wchp=dGLbVzz-zSkzV&md5=f03890b5f072db938346db2475e333b7&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2009.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**, London, v.14, p.383–390, 1997.

_____. What food professionals should know about bacteria biofilms. **British Food Journal**, Bradford, v.108, n.1, p. 27-37, 2006. Disponível em: <<http://www.emeraldinsight.com/Insight/viewPDF.jsp?contentType=Article&Filename=html/Output/Published/EmeraldFullTextArticle/Pdf/0701080103.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2009.

LISITA, M.O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas frescal em uma indústria de laticínios**. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

LIU, Y.Q.; LIU, Y.; TAY, J.H. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v.65, p.143–148, 2004.

LUNDÉN, J.M.; MIETTINEN, M.K.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, n. 9, p. 1204–1207, 2000.

MACEDO, J.A.B. **Águas e águas**. Belo Horizonte: Ortofarma, 2000. 505p.

MAFU, A. A.; DENIS, R.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.9, p.742–746, 1990.

MARQUES, S.C.; REZENDE, J.G.O.S; ALVES, L.A.F; SILVA, B.C.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p.538-543, July 2007.

MARSH, E.J.; LUO, H.; WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEMS Microbiology Letters**, v.228, n.2, p.203-210, Nov. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T2W-49V5DG02/2/48cc72e777610b1bb466d668cda8ae78>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

MARSHALL, K.C.; STOUT, R; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.68, p.337-348, 1971.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resist. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, n.1, p.147–179, Jan. 1999.

MELLEFONT, L.A.; McMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.121, p.157–168, 2008.

MIETTINEN, M.K., BJORKROTH, K.J.; KORKEALA, H.J. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice-cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, p.187–192, 1999.

MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.1, p.92-97, 2005.

MORTON, L.H.G.; GREENWAY, D.L.A.; GAYLARDE, C.C.; SURMAN, S.B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v.41, n.3-4, p.247-259, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_cdi=6030&_pubType=J&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=f2bf8cdf72984ae91ccd14e1671579de&jchunk=41#41>. Acesso em: 11 abr. 2009.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Hamilton, v.49, p.24-32, 1996.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. 6. ed. Villanova: NCCLS, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2008.

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

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** São Paulo, 2005. 141 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

NORTERMANS, S.; DORMANS, J.A.M.A.; MEAD, G.C., Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. **Biofouling**, Chur, v.5, n.1-2, p.21-36, Nov. 1991. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/content~content=a907586393~db=all~order=page>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

NORTERMANS, S., DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.2, p.244–248, Feb. 1998. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1998/00000061/00000002/art00021>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.86, n.4, p. 576-582, Apr. 1999. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119099021/PDFSTART>>. Acesso em: 13 jan. 2009.

OLIVEIRA, C.A.F.; PORTO, E.; BARANCELLI, G.V.; CAMARGO, T.M.; MELLO, L. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* na cadeia de produção do queijo Minas frescal. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL ABRAPA DE INOCUIDADE DE ALIMENTOS, 8., 2009, São Paulo. **Resumos...** p.16-16.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Guildford, v.19, p.178–185, 2008.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.30, n.2, p.295–304, 1998.

PAK, S.; SPAHR, E.; JEMMI, T.; SALMAN, M.D. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.53, p.55-65, 2002.

PAN, Y.; BREIDT, F.J., KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.72, n.12, p. 7711–7717, Dec., 2006.

PAP, K; KISKÓ, G. Efficacy of disinfectants against static biofilms on stainless steel surface. **Acta Alimentaria**, Budapest, v.37, n.1, p. 1–7, 2008.

PARIZZI, S.Q.F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. 1998. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Physiology of biofilms of *thermophilic bacilli*: potential consequences for cleaning. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n.9, p. 553-560, Sept., 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com.w10077.dotlib.com.br/content/6r1tr0qvwway/?p=0c6d04e68a8b4321a1c7cf11d090051b&pi=66>>. Acesso em: 19 mar. 2009.

PASSOS, M.H.C.R. Limpeza de depósitos incrustantes de pasteurizador de leite por detergentes alcalinos e ácidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 105-112, jan./jun. 1994.

PAULING, L. **Química geral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Livro Técnico, 1972. 382p.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **LWT – Food Science and Technology**, London, v.32, n.6, p.321-326, Sept., 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tokey=%23TOC%236944%231999%23999679993%23299879%23FLP%23&_cdi=6944&_pubType=J&_auth=y&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=3bcd076d62ac7b5381e6d55eb760cc4e>. Acesso em: 11 mar. 2009.

PREGNOLATTO, W. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1. 533 p.

PRITCHARD, T.J.; FLANDERS, K.J.; DONNELLY, C.W. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, p.375-384, 1995.

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**, London, v.17, p.361-365, 2000.

RASMUSSEN, O.F.; SKOUBOE, P.; DONS, L.; ROSSEN, L.; OLSEN, J.E. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. **Microbiology**, v.141, n.9, p.2053–2061, Sept., 1995. Disponível em: <<http://intl-mic.sgmjournals.org/cgi/reprint/141/9/2053>>. Acesso em: 11 mar. 2009.

RATTI, R.P. **L. monocytogenes em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle**. 2006. 131 p. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2006.

RIDENOUR, G.M.; ARMBRUSTER, E.H. Bacterial Cleanability of various types of eating surfaces. **American Journal of Public Health**, Washington, v.43, p.138-149, Feb. 1953.

RODRIGUES, D.; ALMEIDA, M.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Biofilms formation by *Listeria monocytogenes* isolates under different growth conditions at refrigeration temperature. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY, 2., 2007, Seville. p. 306.

RODRIGUEZ, A.; AUTIO, W.R.; McLANDSBOROUGH, L.A. Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. **Journal of Food Protection**, Ames, v.71, n.1, p.170–175, 2008.

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

ROSSI, A.C.R. **Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quartenário de amônio utilizado na indústria de laticínios**. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RUSSEL, J.B. **Química geral**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. 1268p.

SANTOS, M.V.; LARANJA DA FONSECA, L.F. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, mar. 2001.

SASAHARA, K.C.; ZOTTOLA, E.A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.12, p.1022–1028, Dec. 1993.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552p.

SOMERS, E.B.; WONG, A.C.L. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, Ames, v.67, n.10, p.2218–2229, 2004.

SPECK, M. L. Starter culture growth and action in milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.45, n.10, p.1281-1286, Oct. 1962.

SPEERS, J.G.S.; GILMOUR, A. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.59, n.4, p.325-332, 1985.

STONE, L.S., ZOTTOLA, E.A. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. **Journal of Food Science**, v.50, n.4, p.951-956, July 1985. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/119507788/abstract>>. Acesso em: 11 jun. 2008.

SURMAN, S.B.; WALKER, J.T.; GODDARD, D.T.; MORTON, L.H.G.; KEEVIL, C.W.; WEAVER, W.; SKINNER, A.; HANSON, K.; CALDWELL, D.; KURTZ, J. Comparison of microscope techniques for examination of biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.25, n.1, p.57-70, Mar. 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T30-3VXN3H0-9-1&_cdi=4932&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=03%2F31%2F1996&_sk=999749998&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkzS&md5=f961a0e79f831168703b3fc78974337f&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2009.

TRONCO, V.M. **Manual para a inspeção da qualidade do leite**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2003. 192p.

TUNCAN, E.U. Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor, and chlorine on *Listeria*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, p.1029-1033, 1993.

WALTON, J.T.; HILL, D.J.; PROTHEROE, R.G.; NEVILL, A.; GIBSON, H. Investigation into the effect of detergents on disinfectant susceptibility of attached *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.105, p.309-315, 2008.

WILKINS, P.O.; BOURGEOIS, R.; MURRAY, R.G.E. Psychrotrophic properties of *L. monocytogenes*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.18, n.5, p.543-547, May. 1972. Disponível em: <<http://rparticle.webp.cisti.nrc.ca/rparticle/AbstractTemplateServlet?calyLang=eng&journal=cjm&volume=18&year=1972&issue=5&msno=m72-087>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

WIRTANEN, G.; MATTITILA-SANDHOLM, T. Removal of foodborn biofilms: Comparison of surface of suspension test. Part. I. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 25, n.1, p.43-49, 1992a.

WIRTANEN, G.; MATTITILA-SANDHOLM, T. Effect of growth phase of foodborn biofilms on their resistance to chlorine sanitizer. Part. II. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 25, n.1, p.50-54, 1992b.

WONG, A.C.L. Biofilms in Food Processing Environments. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.10, p.2765–2770, Oct. 1998.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, n.7, p.3996–4003, July 2004.

ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, v.46, n.1, p.39-56, July 1943. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/reprint/46/1/39>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

ZOLTAI, P.T.; ZOTTOLA, E.A.; McKAY, L.L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.44, p.204-208, 1981.

ZOTTOLA, E.A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for food industry? **Food Technology**, Champaign, v.48, p.107-114, 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)