

**CARACTERIZAÇÃO E ISOLAMENTO DE
MICROORGANISMOS ADERIDOS EM
TUBULAÇÃO DE LATICÍNIO E SEU
COMPORTAMENTO FRENTE À
DETERGÊNCIA**

LARISSA LAGOA RIBEIRO-FURTINI

2005

LARISSA LAGOA RIBEIRO-FURTINI

**CARACTERIZAÇÃO E ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS
ADERIDOS EM TUBULAÇÃO DE LATICÍNIO E SEU
COMPORTAMENTO FRENTE A DETERGÊNCIA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
programa de Pós-graduação em Ciência
dos Alimentos para obtenção do título de
“Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2005**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Ribeiro-Furtini, Larissa Lagoa

Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente a detergência / Larissa Lagoa Ribeiro-Furtini.

– Lavras : UFLA, 2005.

80 p. : il.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Biofilme. 2. Adesão. 3. Microbiologia de alimento. 3. Leite. 4. Qualidade. 5. Microbiota. 6. Detergente. 7. Aço inoxidável. 8. Vidro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CDD-576.163
-637.1**

LARISSA LAGOA RIBEIRO-FURTINI

**CARACTERIZAÇÃO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS
ADERIDOS EM TUBULAÇÃO DE LATICÍNIO E SEU
COMPÓRTAMENTO FRENTE A DETERGÊNCIA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
programa de Pós-graduação em Ciência
dos Alimentos para obtenção do título de
“Doutor”.

APROVADA em 10 de agosto de 2005

| | |
|---|-------------|
| Prof. Dr. Nélio José de Andrade | UFV |
| Prof. Dr. Eduardo Alves | UFLA |
| Prof. Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima | UFLA |
| Prof.ª Dr.ª. Fabiana Queiroz Ferrua | UFLA |



Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL

OFEREÇO

**Ao meu avô Olympio Lagoa
e a minha avó Nena**
(in memoriam)

“Desejando que, de alguma forma, vocês estivessem aqui novamente; desejando que, de alguma forma, vocês estivessem perto. Algumas vezes parecia que, se eu apenas sonhasse, vocês estariam aqui.” **Christine Daaé**, *O Fantasma da Ópera, Ato II, Cena 5.*

DEDICO

**Ao meu esposo Gustavo
e aos meus pais, Júlia e
Walmor**

“As pessoas não se precisam. Elas se completam, não por serem metades, mas por serem pessoas inteiras, dispostas a dividir objetivos comuns, alegria e vida.”
Lya Luft

Amo vocês, obrigada por compartilharem mais esta etapa e desculpem os períodos de ausência e tensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu maior alicerce, minha família: meus pais Júlia e Walmor, meu esposo Gustavo, minhas irmãs Laise e Letícia e meus cunhados Alexandre e Marcello, pela compreensão e apoio incondicionais.

Ao Prof. Luiz Ronaldo de Abreu pela orientação, amizade e compreensão.

À Prof^ª. Roberta Hilsdorf Picolli, pela orientação e disposição em ajudar e pela atenção que, muitas vezes, viabilizaram este trabalho.

Ao Prof. Nélio José de Andrade (UFV), pela gentileza, orientação e disponibilidade em esclarecer as dúvidas.

Ao Prof. José Carlos de Oliveira Lima e à Prof^ª. Fabiana Queiroz Ferrua, pela contribuição valiosa na defesa e correção deste trabalho.

Ao Prof. Eduardo Alves, do departamento de fitopatologia, pelo precioso auxílio em questões relativas à microscopia eletrônica e por ter contribuído na defesa e correção deste trabalho.

Ao Prof. Júlio Bueno, do departamento de estatística, pela análise dos dados desta pesquisa.

Aos demais professores e funcionários da Pós-graduação do departamento de ciência dos alimentos, pela contribuição durante a fase acadêmica e na execução deste trabalho, em especial: Prof. Paulo Clemente, Prof^ª. Maria Cristina Bressan, Prof. Alexandre Tourino e Prof. Eduardo Valério Vilas-Boas; aos técnicos e funcionários: Seu Cipriano, Cleuza, Tina, Sandra, Rafaela e Dona Ivone.

À estagiária e amiga Camila Coelho, minha fiel “escudeira”, pela contribuição e dedicação extremas e pela companhia nas noites e madrugadas em análises no laboratório.

A todos os estagiários do laboratório de microbiologia de alimentos, em especial, a Suzana, Marina e Maíra, que trabalharam nesta pesquisa com dedicação e responsabilidade.

À amiga e primeira orientadora Daise Rossi, por não ter deixado de me orientar até hoje.

Aos colegas que estiveram sempre presentes, citados não por ordem de importância, mas por ordem de entrada em minha vida: Cláudia Eugênia Castro-Bravo, Roberto Maciel, Alexandre Tourino, Patrícia Silveira, Gilson Matioli, Daniela Hirsch, Alessandra Santos, Carolina Valeriano, Mônica Torres Prado, Clube Boari, Belami, Simone Marques e Jaíne Resende.

Às pequenas grandes companheiras, Indy e Zora Blue, pelo amor e alegria.

À ECOLAB, na pessoa do Sr. Amauri Pires, pelo fornecimento do detergente enzimático.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto.

À Universidade Federal de Lavras pela disponibilização de pessoal e instalações.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | iii |
| CAPÍTULO 1: Considerações gerais sobre qualidade do leite e seu comprometimento pelo processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos | 01 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 02 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 05 |
| 2.1 Qualidade do leite..... | 07 |
| 2.2 Alteração da qualidade do leite por microrganismos psicrotróficos..... | 13 |
| 2.3 Mecanismo de adesão bacteriana e formação de biofilmes | 18 |
| 2.3.1 Parâmetros importantes na adesão..... | 20 |
| 2.3.1.1 Superfícies de adesão..... | 20 |
| 2.3.2 Microrganismos envolvidos no processo de adesão bacteriana..... | 21 |
| 2.4 Problemas ocasionados por biofilmes..... | 23 |
| 2.5 Métodos de detecção e quantificação de biofilmes..... | 24 |
| 2.6 Higienização na indústria de laticínios..... | 27 |
| 2.7 Detergentes..... | 28 |
| 2.7.1 Detergentes alcalinos..... | 29 |
| 2.7.2 Detergentes ácidos..... | 30 |
| 2.7.3 Detergentes enzimáticos..... | 30 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 31 |
| CAPÍTULO 2: Caracterização da microbiota e isolamento de <i>Pseudomonas</i> spp em tubulação de laticínio após limpeza alcalina e ácida | 38 |
| RESUMO | 39 |
| ABSTRACT | 40 |
| 1 INTRODUÇÃO | 41 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 2.1 Coleta | 43 |
| 2.2 Análise | 43 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4 CONCLUSÕES | 49 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| CAPÍTULO 3: Avaliação do processo de adesão por <i>Pseudomonas</i> spp mesófila e psicrotrófica em superfícies de vidro e aço inoxidável e comportamento frente à detergência | 52 |
| RESUMO | 53 |
| ABSTRACT | 54 |

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 55 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 58 |
| 2.1 Microrganismos selvagens..... | 58 |
| 2.1.1 Psicrotrófico | 58 |
| 2.1.2 Mesófilo..... | 58 |
| 2.2 Curva de crescimento | 59 |
| 2.2.1 Cepa psicrotrófica | 59 |
| 2.2.2 Cepa mesófila | 59 |
| 2.3 Preparação dos cupons de prova | 59 |
| 2.4 Modelo experimental para verificar a eficiência do processo de adesão de <i>Pseudomonas</i> spp cepa psicrotrófica e mesófila | 60 |
| 2.5 Determinação do número de células bacterianas aderidas | 61 |
| 2.5.1 Aço inoxidável – cepa mesófila e psicrotrófica | 61 |
| 2.5.2 Vidro – cepa mesófila e psicrotrófica..... | 62 |
| 2.6 Teste de eficiência da detergência | 62 |
| 2.6.1 Detergente alcalino | 63 |
| 2.6.2 Detergente ácido | 64 |
| 2.6.3 Detergente enzimático | 64 |
| 2.7 Biotransferência | 64 |
| 2.8 Análise dos cupons por microscopia eletrônica de varredura | 66 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 66 |
| 3.1 Curva de crescimento | 66 |
| 3.1.1 Cepa psicrotrófica | 67 |
| 3.1.2 Cepa mesófila | 68 |
| 3.2 Avaliação da adesão de <i>Pseudomonas</i> spp psicrotrófica e mesófila em aço inoxidável e vidro | 69 |
| 3.2.1 <i>Pseudomonas</i> spp psicrotrófica | 69 |
| 3.2.2 <i>Pseudomonas</i> spp mesófila | 70 |
| 3.3 Eficiência da detergência sobre a adesão em aço inoxidável | 71 |
| 3.4 Potencial de biotransferência | 74 |
| 4 CONCLUSÕES | 75 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 76 |

RESUMO

RIBEIRO-FURTINI, Larissa Lagoa. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência** 2005. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Para avaliação da eficiência da limpeza alcalina e ácida em tubulação de laticínio da região de Lavras, foram amostrados locais de possível formação de biofilmes depois da saída do pasteurizador. A coleta foi realizada pela técnica do esfregaço em superfície, os *swabs* utilizados foram levados ao vórtex em solução salina e a mesma sofreu diluições seriadas; as alíquotas foram plaqueadas pela técnica *pour plate* e incubadas a 35 °C por 48 h e 7 °C por 10 dias, com objetivo de selecionar, respectivamente, microrganismos mesófilos e psicrotróficos. O local de maior contaminação foi escolhido para a caracterização da microbiota (Gram, morfologia, crescimento em MacConkey, Oxidação/Fermentação, oxidase) e identificação de *Pseudomonas* spp pelo Api 20E para utilização na etapa seguinte. No local 5, o mais contaminado, foram obtidos valores de $2,7 \times 10^5$ e $2,9 \times 10^5$ UFC/cm² respectivamente, para mesófilos e psicrotróficos. Estes resultados só permitem afirmar processo de adesão e não de formação de biofilme; nos outros locais não houve contagem expressiva ($>10^4$). Foram selecionadas duas cepas de *Pseudomonas* spp, mesófila e psicrotrófica, cuja adesão em aço inoxidável e vidro foi avaliada por simulação *in vitro* usando como meio de cultura o leite. Cupons de aço inoxidável AISI 304 de 10x15mm foram submergidos em leite sob agitação por 18 h a 35 °C para cepa mesófila e 25 °C para cepa psicrotrófica. O Becker de vidro, em que foi colocado o leite, teve sua superfície externa marcada por três retângulos que perfaziam cada um a área de 10 cm². Após o tempo de incubação três cupons foram removidos e suas superfícies amostradas pela técnica do esfregaço. Em seguida três cupons para cada tratamento foram retirados e enxaguados e, após os tratamentos (limpeza alcalina, limpeza alcalina e ácida e limpeza enzimática) submetidos à técnica do esfregaço. O Becker após esvaziamento, foi enxaguado e as superfícies demarcadas amostradas pelos *swabs*. Todas as amostras com o *swab* em solução foram diluídas, plaqueadas e incubadas nas temperaturas ideais. Quando os cupons foram retirados para os tratamentos, os três restantes foram enxaguados e passados para Becker com leite estéril, no qual ficavam 24 h sob agitação. Este procedimento era feito para cepa psicrotrófica e cepa mesófila, cada qual incubado à sua temperatura ótima. Alíquotas deste leite foram analisadas para contagem geral de mesófilos e psicrotróficos de 6 em 6 h, com o objetivo de verificar a biotransferência dos cupons para o meio circundante; a técnica

utilizada foi a de semeadura das diluições seriadas em placas pelo método *pour plate*, respeitando a temperatura de cada cepa. Os cupons foram preparados e visualizados em microscópio eletrônico de varredura para verificação da adesão e eficiência dos tratamentos. A cepa psicrotrófica com 18 h de contato obteve média de adesão em cupom de aço inoxidável de $4,4 \times 10^5$ UFC/cm² e, em vidro de $1,7 \times 10^4$ UFC/cm². Para a cepa mesófila, a contagem total em UFC/cm² foi de $4,6 \times 10^3$ para a superfície de aço inoxidável e, de $3,2 \times 10^2$ para o vidro. A microscopia eletrônica de varredura permitiu visualizar a adesão de *Pseudomonas* spp psicrotrófica e mesófila na superfície dos cupons de aço inoxidável, sem formação de estruturas de adesão (exopolissacarídeos). No teste da detergência, os três tratamentos não apresentaram diferença, uma vez que todos os tratamentos reduziram a < 10 UFC/cm² o número de células aderidas. Houve transferência importante de *Pseudomonas* spp dos cupons aderidos para o meio circundante. Para a cepa psicrotrófica foram obtidas contagens de $5,0 \times 10^8$ UFC/mL em média e a cepa mesófila $3,2 \times 10^7$ UFC/mL ao final de 24 horas.

* Comitê orientador: Prof. Luiz Ronaldo de Abreu - PhD (orientador)- UFLA, Prof^ª Dr. Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA, Prof. Dr. Nélío José de Andrade – UFV .

ABSTRACT

RIBEIRO-FURTINI, Larissa Lagoa. **Characterization and isolation of microorganisms adhered to dairy plant pipeline and their behavior against detergency.** 2005. 80p. Thesis (Doctorate in Food Science). Federal University of Lavras, Lavras, MG.

To evaluate the efficiency of alkaline and acidic cleaning in a pipeline of a dairy factory in the region of Lavras-MG, possible spots for biofilm formation from pasteurizer outlet to packaging were sampled. The collection was accomplished by the surface scrubbing technique; the swabs utilized were taken into the vortex in salt solution and this underwent serial dilutions; the aliquots were plated by the pour plate technique and incubated at 35 °C for 48 hours and 7 °C for 10 days, with the purpose of selecting, respectively, mesophylic and psychrotrophic microorganisms. The spot of greatest contamination was chosen for the characterization of the microbiota (Gram, morphology, growth in MacConkey, O/F, oxidase) and identification of *Pseudomonas* spp by the Api 20E for the use in the next step. Two strains of *Pseudomonas* spp, mesophylic and psychrotrophic, whose adhesion to stainless steel and glass was evaluated by *in vitro* simulation by using milk as a culture medium were selected. Stainless steel AISI 304 tabs (10 x 15 mm) were submerged into milk under stirring for 18 h at 35 °C for the mesophylic strain and 25 °C for psychrotrophic one. The glass beacker in which milk was poured had its external surface marked by three rectangles which made up an area of 10 cm². After the incubation time, three tabs were removed and their surfaces sampled by the scrubbing technique. Next, three tabs for each treatment were removed and rinsed and, after the treatments –alkaline cleaning, alkaline and acid cleaning and enzymic cleaning – submitted to the scrubbing technique. The beacker after emptying was cleaned with distilled sterile water and the delimited surface sampled by swab. All the samples with the swab were diluted in solution, plated and incubated at the suitable temperatures. When the tabs were removed for the treatments, other three were rinsed and passed into the beacker with sterile milk, in which they stayed for 24 h under stirring., this procedure was done for the tabs of psychotropic and mesophylic strains, each one incubated at its optimum temperature; aliquots of milk were analyzed for general count of mesophylic and psychotropic strains every 6 hours with the objective of verifying the biotransference from the coupons to the surrounding medium, the technique utilized was the one of seeding of the serial dilutions on plates by the *pour plate* method, respecting the temperature of each strain. The tabs were prepared and viewed under a scanning electron microscope for verification of

the adhesion and efficiency of the treatments. The psychrotrophic strain with 18 hours contact obtained mean of adhesion to stainless steel coupon of 4.4×10^5 CFU/cm² and to glass of 1.7×10^4 CFU/cm². For the mesophylic strain, the results did not enable one to claim a significant adhesion, the total count in CFU/cm² was of 4.6×10^3 for the stainless steel surface and of 3.2×10^2 for the glass. The scanning electron microscopy enabled to view the adhesion of mesophylic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp to the surface of the stainless steel coupons, with no formation of adhesion structures (formation of exopolysaccharides). In the detergency test, the three treatments: alkaline cleaning, alkaline and acidic cleaning and cleaning with enzyme detergent showed no difference, since all the treatments reduced to $<10/cm^2$ the number of adhered cells. There was an important transfer of *Pseudomonas* spp from the adhered coupons to the surrounding medium. For the psychrotrophic strain, counts of 5.0×10^8 CFU/mL, on average, and for the mesophylic strain, 3.2×10^7 CFU/mL at the final of 24 hours.

* Guidance Committee: Prof. Luiz Ronaldo de Abreu -PhD (Adviser) – UFLA, Prof^ª Dr^ª. Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA and Prof. Dr. Nélio José de Andrade – UFV.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE QUALIDADE DO LEITE E SEU COMPROMETIMENTO PELO PROCESSO DE ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Fonte importante de nutrientes para a população, o leite e seus derivados podem ter a qualidade microbiológica comprometida por diversos fatores: sanidade do rebanho, práticas inadequadas de manipulação e higienização de superfícies, acondicionamento impróprio, dentre outros. Há de se considerar um problema importantíssimo relativo à matéria-prima da indústria de laticínios; o leite constitui meio ideal para proliferação de microrganismos, considerando seu alto valor nutricional, pH e atividade de água adequados.

Apontados como geradores de problemas tecnológicos em indústrias de laticínios, os biofilmes, inicialmente formados pela adesão de determinados microrganismos às superfícies, são ocasionados por falhas no processo de higienização e, podem ser definidos, como uma matriz exopolimérica que fixa a bactéria na superfície, canaliza vários nutrientes junto a esses organismos, favorecendo o crescimento e formação de colônias, tornando-se ponto crônico de contaminação. Microrganismos patogênicos e deteriorantes participam desse processo, podendo causar danos à saúde do consumidor e levar a grandes prejuízos econômicos. Além disso, os biofilmes podem ocasionar a redução da eficiência de transferência de calor do fluxo nas tubulações e desencadear processos corrosivos em equipamentos e utensílios.

Formação de biofilmes ou *Biofouling* (termo usado para biofilme indesejável), ocorre também em superfícies de aparelhos médicos, cavidade oral, sistemas de refrigeração de água, equipamentos de indústrias de alimentos e cascos de navios, sendo reconhecido como um problema corriqueiro, porém, de difícil solução. Tendo a adesão bacteriana como pré-requisito para a constituição do biofilme, prevenindo-a causaria maior impacto no controle de formação do mesmo, (Liu & Zhao, 2005).

Em laticínios as bactérias comumente isoladas em processo de adesão ou biofilme, são microrganismos psicrotróficos, capazes de crescer a 7 °C; a adoção de práticas de estocagem do leite sob refrigeração desde a fonte de produção até a mesa do consumidor controla a deterioração dos produtos por microrganismos mesófilos, mas acaba por selecionar os psicrotróficos. Martins et al. (2005) isolaram bactérias do gênero *Pseudomonas* em tanques de resfriamento e associam a deterioração de leite cru e produtos lácteos, pela produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis destes microrganismos.

Como a refrigeração se faz indispensável, a melhor maneira é evitar que estes microrganismos cheguem até o leite, utilizando-se de ferramentas de garantia da qualidade, como as boas práticas de manuseio e fabricação, dando enfoque aos procedimentos padrão de higiene operacional. Geralmente, limpeza efetiva e programa de sanitização inibem a formação de biofilmes.

Os tratamentos mecânicos e a quebra química da matriz de polissacarídeos são necessários para a remoção de biofilmes, as bactérias aderidas são cobertas com material orgânico - polissacarídeos e resíduos de alimentos - que pode inibir a penetração do desinfetante devido à perda de propriedades umectantes. Portanto, a atividade de detergentes é necessária para remover essa camada externa, antes da utilização de desinfetantes. A massa microbiana morta deve ser removida, pois, do contrário, pode agir como um filme condicionante e como fonte de nutrientes para uma posterior formação de biofilme. Novos agentes de limpeza e tratamentos enzimáticos estão sendo formulados para a remoção efetiva de biofilmes (Forsythe, 2002).

Particularmente, em laticínios que trabalham com a limpeza CIP (Clean in Place), em qualquer etapa do processamento, o contato por abrasão física não é possível, dificultando o processo de remoção mecânica, o mais eficiente, do biofilme. Os detergentes mais comumente utilizados são o hidróxido de sódio para limpeza alcalina e ácido nítrico para a limpeza ácida, ambos geralmente a

1%, que agem em extremos de pH sob temperaturas elevadas e são apontados como agentes corrosivos e nocivos ao meio ambiente. Os detergentes enzimáticos, além de operarem em pH neutro e em temperaturas abaixo de 40 °C, economizando energia, são menos corrosivos e seus resíduos menos prejudiciais.

A busca por resultados concernentes a detergente enzimático e processo de adesão, justifica-se pela escassez de dados e pela necessidade de apontar alternativas com custo-benefício considerável que atenda a produtores e industriais. Perante o exposto, foram determinados os seguintes objetivos:

- Quantificar e isolar a microbiota da tubulação da linha de pasteurização de laticínio após limpeza alcalina e ácida, da saída do pasteurizador até a empacotadeira.

- Verificar a eficiência do processo de adesão *in vitro* para aço inoxidável e vidro, de *Pseudomonas* spp mesófila e psicrotrófica isoladas de tubulação de laticínio.

- Comparar a eficiência de detergentes alcalino, ácido e enzimático na redução logarítmica do processo de adesão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Qualidade do leite

A quantidade de produtos disponíveis no mercado nacional oferece ao consumidor a oportunidade de ampla escolha. Um dos principais pré-requisitos considerados durante a aquisição é a qualidade do produto, juntamente com o preço. O conceito de qualidade compreende o conjunto de características que vão diferenciar as unidades de um produto as quais possuem importância na determinação do grau de aceitabilidade daquela unidade pelo comprador/consumidor, e, no caso do leite, refletem tanto no leite fluido quanto em seus derivados.

Todos os especialistas na área de laticínios concordam que a qualidade do leite pode ser definida e medida levando em consideração cinco aspectos: composição química, contagem total de bactérias, contagem de células somáticas (CCS), integridade (sem adição de água ou outras substâncias) e o aspecto estético (Abreu, 1999).

A importância da qualidade do leite tem como base dois aspectos fundamentais. O primeiro refere-se ao fato do leite constituir alimento de extrema importância, por possuir elementos nutricionais necessários à manutenção da saúde, especialmente de crianças e idosos; definidos como grupo de risco dentro do conceito de segurança alimentar. O segundo porque o leite serve eficientemente como veículo de microrganismos patogênicos, muitos dos quais causadores de doenças graves, como a tuberculose, brucelose, dentre outras. Pinto & Viana (2002) citam como exemplo de microrganismos associados a surtos e casos de toxinfecções em consequência do consumo de leite e de produtos lácteos contaminados com os seguintes microrganismos: *Coxiella*,

Salmonella, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Outro fator importante é a microbiota deteriorante, formada principalmente, por bactérias psicotróficas que vão reduzir a qualidade e a vida de prateleira do leite e seus produtos derivados. Segundo Dunstall et al. (2005) o advento comum do uso de refrigeração no leite cru criou condições seletivas para as bactérias psicotróficas, em particular as do gênero *Pseudomonas*.

Psicotróficos são microrganismos capazes de apresentar crescimento considerável em temperaturas entre 0 °C e 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento, de 25 °C a 30 °C. Os psicotróficos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos e apresentam, aproximadamente, 15 gêneros diferentes que foram isolados do leite e produtos derivados Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, vibrios, formadores ou não de esporos; assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios. Alguns gêneros de fungos filamentosos e leveduras também apresentam características do grupo dos psicotróficos e podem causar problemas de qualidade no leite (Cousin, 1982).

Visando à melhoria da qualidade do leite, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) constituiu novas regras para a produção de leite pela Instrução Normativa 51 (IN 51), que entrou em vigor dia 1º de julho de 2005, estabelecendo critérios mais rígidos para a produção, identidade e qualidade dos leites A, B e C, quando pasteurizados ou crus; em relação à qualidade microbiológica, foram preconizados também padrões mais rigorosos para CCS e contagem total de bactérias. A IN 51 regulamenta, ainda, os critérios técnicos de coleta de leite cru refrigerado e o seu transporte a granel.

2.2 Alteração da qualidade do leite por microrganismos psicrotróficos

O leite é uma emulsão natural, cujos glóbulos de gordura, estão mantidos em suspensão, em líquido salino açucarado, devido à presença de substâncias protéicas e minerais em estado coloidal. Representa o produto íntegro da ordenha total e sem interrupção de fêmea leiteira em bom estado de saúde, bem alimentada e sem sofrer cansaço, isento de colostro, recolhido e manipulado em condições higiênicas (Abreu, 1999). O leite formado nas células secretoras do animal é livre de bactérias. Entretanto, sabe-se que o leite, mesmo ordenhado sob as mais rigorosas condições de higiene, possui uma certa quantidade de bactérias, que tem seu número elevado quando em contato com o exterior. A contaminação do leite pode ser dividida em endógena e exógena e sua intensidade depende de vários fatores. Suárez e Ferreros (1991) citam três fontes de contaminação bacteriana para o leite cru: interior do úbere, tetas e equipamentos para estocagem e processamento de leite.

A população bacteriana do leite produzido sob condições normais de higiene, deve conter menos que 10% de psicrotróficos; entretanto na prática observa-se que esses microrganismos às vezes chegam a constituir mais de 75% da população total em condições pouco higiênicas (Cousin, 1982). Entre as bactérias Gram-negativas, o gênero *Pseudomonas*, especialmente espécies de *Pseudomonas fluorescens*, é o mais comumente encontrado, sendo *Bacillus* o representante dos psicrotróficos Gram-positivos (Bendicho, Barbosa-Canovas e Martin, 2003). Embora a proporção de *Pseudomonas spp* na população total de bactérias no leite fresco, usualmente não excede 10% , este gênero lidera como o mais significativo psicrotrófico que ocasiona deterioração em leite cru e pasteurizado (Cousin, 1982) e inclui espécies com tempo de geração curto em temperaturas entre 0 °C a 7 °C, sendo a temperatura teórica mais baixa de crescimento a de -10 °C (Cempírková, 2002).

Outros exemplos de psicrotróficos são os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium*. Como não utilizam a lactose como principal fonte de energia, estes microrganismos não acidificam o leite, entretanto produzem enzimas, principalmente proteases e lipases, que causam prejuízos à qualidade do leite e, principalmente, dos produtos elaborados, já que são capazes de crescer e manter atividade até mesmo em temperaturas de refrigeração.

O leite contém enzimas endógenas e exógenas. As exógenas consistem, principalmente, daquelas produzidas por bactérias psicrotróficas (lipases e proteases) que são termorresistentes. As endógenas têm nas hidrolases o grupo mais significante, como exemplo as lipases, plasmina e fosfatase alcalina. Os problemas que as enzimas exógenas causam ao leite dependem de sua concentração. Dessa forma, deve-se produzir, manipular, conservar o leite de forma adequada para diminuir ao máximo a presença de bactérias psicrotróficas. *Pseudomonas fluorescens* é a que ocorre com maior freqüência e abundância e, quando seu número ultrapassa 10^6 UFC/mL, número não difícil de ser alcançado, quando as condições de produção do leite não são adequadas, há produção de enzimas e a qualidade fica comprometida. Segundo Stepaniak (1995), citado por Sorhaug e Stepaniak (1997), a eficiência da pasteurização, baseada na atividade residual da fosfatase alcalina indígena do leite, pode ser inválida para leite refrigerado, porque as bactérias psicrotróficas produzem fosfatases termo resistentes.

Espécies psicrotróficas de *Pseudomonas* não sobrevivem à pasteurização, quer seja no processo LTLT (Low Temperature Long Time), ou no HTST (High Temperature Short Time), ou UAT (Ultra Alta Temperatura), mas suas enzimas sim. No entanto muitos mesófilos termodúricos e termófilos (muitas espécies de *Bacillus*) podem sobreviver a esses processos (Griffiths & Phillips, 1986).

Segundo Jayarao & Wang (1999) quando são utilizados tratamentos severos por calor para preparar produtos derivados do leite, eles não são suficientes para inativar todas as enzimas. Efeitos adversos do calor no produto limitam a extensão de tratamentos térmicos que podem ser utilizados. A atividade de proteases e lipases que sobreviveram ao tratamento térmico podem causar alterações nas propriedades funcionais e sabor de produtos lácteos, incluindo leite em pó. Sorhaug & Stepaniak (1997) relatam que muitas *Pseudomonas* secretam um único tipo de proteinase, outras secretam duas ou três quando estão em baixas temperaturas e meio mais ácido. O tratamento térmico a 150 °C por 20 segundos pode reduzir a atividade de três hidrolases de *Pseudomonas* a 90%. Porém, este tratamento pode transformar o leite em líquido marrom por causa da reação de Maillard. O cálcio estimula a secreção de proteases e lipases de algumas cepas de *P. fluorescens* e estes íons são necessários para desestabilizar proteínas no processo UAT.

O gênero *Pseudomonas* apresenta capacidade de secreção de metaloproteases que possuem elevada resistência térmica preservando sua atividade enzimática mesmo após a pasteurização, tratamento UAT ou tratamento com baixas temperaturas (Griffiths & Phillips, 1986).

Enzimas intracelulares e àquelas associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite quando ocorre lise das células bacterianas, após o tratamento térmico e, desta forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite. De acordo com Jaspe et al., (1995), o gênero *Pseudomonas*, após sofrer incubação em baixas temperaturas (7 °C) durante o período de três dias, apresenta atividade proteolítica cerca de 1000 vezes maior, atividade lipolítica cerca de 280 vezes maior e taxa de crescimento aproximadamente 10 vezes superior, quando comparadas com amostras que não sofreram tal período de incubação. Estes resultados indicam que o gênero *Pseudomonas* apresenta alto potencial de deterioração dos

componentes do leite quando submetidas a períodos prolongados de refrigeração. É importante salientar, como registram Sorhaug & Stepaniak (1997), que além das enzimas extracelulares, os psicrotóxicos Gram-negativos produzem inúmeras enzimas celulares tais como, aminopeptidases, endopeptidases, carboxipeptidases e esterases.

Até recentemente, leites em pó eram considerados relativamente inertes a perspectivas biológicas por causa da baixa atividade de água, que desfavorece o crescimento microbiano. Contudo, evidências vêm acumulando no sentido de que mudanças em leite em pó durante armazenamento não são causadas somente por reações químicas, mas também, por atividades enzimáticas. Muitas enzimas sobrevivem a tratamentos térmicos aplicados no processamento de leite e leite em pó, particularmente proteinases e lipases de *Pseudomonas* e algumas espécies de *Bacillus*. Essas enzimas podem causar deterioração de produtos finais durante a estocagem (Deeth & Touch, 2000; Matta & Punj, 1999).

As enzimas extracelulares são usualmente produzidas no final da fase log e no começo da estacionária, quando os microrganismos alcançam uma relativa elevada densidade celular ($>10^6$ UFC/mL). Presumivelmente, os microrganismos secretam essas enzimas para degradar proteínas e componentes lipídicos do leite para suprir aminoácidos/peptídeos, ácidos graxos, respectivamente, para seu metabolismo, contribuindo para sua vantagem seletiva (Dunstal et al., 2005; Jaspe et al., 1995).

As proteases são as enzimas que causam maiores prejuízos econômicos para a qualidade do leite e seus produtos; elas atuam sobre a proteína do leite (principalmente sobre a K- e β -caseínas), causando diminuição no rendimento do leite em queijos, sabor amargo no leite e seus produtos e gelificação do leite esterilizado (UAT). Segundo Sorhaug & Stepaniak (1997), a produção de proteases por psicrotóxicos é normalmente no final da fase exponencial (log) ou na estacionária.

As lipases atuam sobre a gordura do leite liberando ácidos graxos que, quando livres, causam sabor de ranço no leite e seus derivados, principalmente em queijos de maturação, onde acarretam sabor de “sabão”. Essas lipases não possuem especificidade, liberando nesses produtos ácidos graxos de cadeias de vários tamanhos, sendo os de cadeia longa os principais geradores de sabores desagradáveis nos queijos. O defeito é agravado quando o leite é submetido a agitações severas, pois, nesses casos, a gordura é “quebrada” em glóbulos menores, facilitando a atuação da enzima. Suaréz et al. (1991) descrevem que as proteases e lipases estão ligadas às alterações de sabor, como gosto amargo, pútrido, rancidez e defeitos relacionados com a degradação entre eles a coagulação, espessamento e redução do rendimento de queijos.

Deterioração por GNP (Gram Negative Psychrotrophic) é mais provável que seja causada por contaminação pós-pasteurização, uma vez que este tipo de bactéria não resiste ao processo. Recontaminação em leite pasteurizado ocorre em vários países. Psicotróficos Gram negativos, como *Pseudomonas* spp são a microbiota dominante que foi isolada em aproximadamente 90% de amostras de leite pasteurizado refrigerado coletado de diferentes laticínios na Austrália (Craven & Macauley, 1992). No Reino Unido quase todos os pacotes de leite obtidos de diferentes plantas de laticínio estavam contaminados por GNP. Bactérias psicotróficas, particularmente *Pseudomonas* spp, são as principais determinantes da vida de prateleira de leites pasteurizados na Europa. Essa realidade é um contraste com os Estados Unidos, onde formas esporuladas de *Bacillus* spp, incluindo cepas psicotróficas são, talvez, mais importantes (Schroder, 1984).

Muitas bactérias Gram-negativas, incluindo membros do gênero *Pseudomonas*, regulam a expressão gênica de acordo com o tamanho de sua população, pela percepção dos níveis de homoserina lactona (HSL) moléculas sinalizadoras que elas produzem e liberam no meio. Este fenômeno é chamado

de *quorum sensing* e parece ser um processo de conservação entre os procariotos desde que muitas bactérias têm mostrado a exploração do dispositivo de comunicação célula-célula para regular os diversos processos fisiológicos. Portanto, a suposição de que a indução da produção de enzimas extracelulares pode ser de acordo com o controle do fenômeno *quorum sensing* parece plausível. É sabido que a produção destas enzimas contribui para a vantagem seletiva dos psicrotróficos e, portanto, tem um efeito significativo na cinética de crescimento (Chapon-Herve et al., 1997; Dunstall et al., 2005; Salmond et al., 1995).

A prevalência de *P. fluorescens* pode ser explicada pelo fato desse microrganismo possuir tempo de geração curto em temperaturas de refrigeração. Pesquisas mostraram que o tempo de geração de *P. fluorescens* era de 30,2 h entre 0 e 2 °C, 6,7h entre 4 e 6 °C e, 1,4h a 20 °C. A habilidade de crescer rápido em temperaturas baixas coloca *P. fluorescens* em vantagem em relação a outras bactérias Gram-negativas. Em adição, *P. fluorescens* também produz exopolissacarídeos adesivos, os quais facilitam a formação do biofilme. Uma vez que o biofilme é formado, *P. fluorescens* pode criar reserva potencial de bactérias e resistir ao efeito de químicos e sanitizantes, podendo, inclusive, contaminar tanques de expansão quando liberada de um biofilme (Deeth & Touch, 2000).

Craven & Macauley (1992) analisaram amostras de leite pasteurizado que apresentaram *Pseudomonas* spp e observaram que estas amostras possuíam a vida de prateleira mais curta do que as que continham outras bactérias como *Flavobacterium* spp e *Acinetobacter* spp.

É muito provável que essas contaminações sejam em função da adesão e colonização de superfícies por microrganismos que, posteriormente, formam o biofilme e depois liberam as células para o meio contaminando o alimento.

2.3 Mecanismo de adesão bacteriana e formação de biofilmes

É metabolicamente favorável aos microrganismos aderir às superfícies, onde os nutrientes estão mais concentrados do que na interface. Uma vez aderidos, os microrganismos capturam e metabolizam nutrientes, excretam catabólitos, produzem estruturas ou materiais que ajudam na adesão e multiplicam na formação de uma estrutura complexa, conhecida como biofilme (Chen, Daniel e Coolbear, 2003). Esta população heterogênea de microrganismos é ubíqua na natureza, ou seja, capaz de colonizar qualquer ambiente e representa populações de células que possuem interdependência funcional uma sob as outras e, coletivamente, oferece atividades microbianas que não são possíveis por nenhuma das espécies individualmente (Gilbert, McBain e Rickard, 2003; James, Beaudette e Consterton, 1995).

Mecanismo de adesão microbiana e formação de biofilme é um processo complexo que começa com a adesão de uma única bactéria. Nas indústrias de processamento de alimentos, o tempo requerido para este evento pode ser relativamente pequeno, dependendo do meio circundante, da superfície e da bactéria. Por exemplo, um meio com alta força iônica pode proteger a repulsão eletrostática da interação entre célula e superfície e facilitar a chegada da célula na superfície. Superfícies comumente em contato com alimentos, como vidro, aço inoxidável, propileno e borracha, mesmo quando novas, podem apresentar fissuras e fendas grandes o suficiente para esconder bactérias. Características bacterianas como cargas, hidrofobicidade e apêndices podem promover e melhorar o processo de adesão (Mafu et al., 1990). A formação de biofilme vem sendo descrita como influenciada pelas condições do substrato seguido pela redução na motilidade de células planctônicas, levando à adesão e fixação das bactérias como microcolônias (Pink et al., 2004).

Vários mecanismos para adesão em diferentes superfícies têm sido propostos. Na primeira teoria acredita-se que a adesão bacteriana ocorre

geralmente em dois estágios: a aproximação inicial, seguida pelo contato físico com a superfície. Pelo ponto de vista termodinâmico, a direção da força de adesão é minimizada pela energia livre. Em distâncias com aproximadamente 50nm, a aproximação das células pode ser afetada por interações hidrofóbicas; forças de Van der Waals podem agir num perímetro relativamente grande. Quando a distância de separação da bactéria e superfície decresce a menos de - 20nm, atrações eletrostáticas ou repulsões, potencialmente as forças mais fortes envolvidas, podem começar a contribuir para o processo de adesão. Quando as células são atraídas para perto da superfície (5 nm), interações específicas podem transpor a distância e levar à adesão irreversível. Esporos geralmente aderem à superfície com força maior que as células vegetativas, porque o processo é facilitado pela sua alta hidrofobicidade e superfície de cobertura com estruturas semelhantes a cabelos. Na seqüência à adesão, esporos podem germinar e as células vegetativas podem se multiplicar e produzir polissacarídeos extracelulares. Essas colônias continuam crescendo progressivamente e cobrindo a superfície inteira pela adesão de uma única célula, então, o biofilme é formado (Bower, McGuire e Daeschel, 1996).

Na segunda teoria, são enumeradas cinco etapas, na ordem seguinte: transporte de nutrientes e matéria orgânica e inorgânica para uma superfície sólida; formação de uma camada com nutrientes orgânicos e inorgânicos; adesão dos microrganismos à superfície e multiplicação celular; intensa atividade metabólica do biofilme (Characklis, 1984).

Outra teoria propõe que a adesão se divide em três etapas: fixação da bactéria à superfície, consolidação da bactéria à superfície e crescimento da bactéria na superfície (Zottola, 1994). Nesta teoria a consolidação é considerada um estágio importante, pois os microrganismos que produzem material extracelular propiciam a fixação das células nas superfícies e, neste ponto, as

células fixadas não são removidas sem ação mecânica ou química (Schwach & Zottola, 1982, citado por Andrade & Brabes, 2003)

Algumas macromoléculas bacterianas envolvidas na adesão não se encontram covalentemente ligadas às células bacterianas. Estas geralmente correspondem a polissacarídeos sintetizados e secretados pelas bactérias. Um envoltório polimérico o qual consiste em camada densa e bem definida, circundando internamente a célula, é conhecido como glicocálix, enquanto uma massa difusa de fibras poliméricas, aparentemente não ligadas a qualquer célula única, é denominada camada limosa (Madingan, Martinko e Parker, 2004). O glicocálix faz parte da constituição da membrana externa das bactérias Gram-negativas e do peptidoglicano das bactérias Gram-positivas.

Durante a multiplicação celular, substâncias poliméricas extracelulares (EPS) são secretadas pelos microrganismos e constituem-se de substâncias orgânicas como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos. Devido à natureza extremamente heterogênea da EPS, sua função não está ainda bem estabelecida. Contêm vários grupos funcionais como carboxil, amina e grupo fosfato e, sabe-se que exercem papel importante na formação e função das colônias de microrganismos e atuam na adesão, formação de glicocálix e alguns processos fisiológicos (Beech & Sunner, 2004).

A interação de diferentes populações, durante o primeiro estágio da formação do biofilme tem um efeito significativo na estrutura e fisiologia do biofilme bacteriano, as espécies de colonização inicial podem facilitar a colonização de outras espécies que são fisiologicamente compatíveis, inibindo a aderência de outras não compatíveis. Estes colonizadores iniciais ou primários modificam as características da superfície aderida pelo seu crescimento e reprodução, contribuindo para adesão de bactérias secundárias, detritos orgânicos e minerais. A formação de biofilmes por comunidades microbianas, isto é, espécies mistas, é mais estável e resistente quando comparada a biofilmes

de monoespécies (Beech & Sunner, 2004; Erlandsen, Kristich e Dunny, 2004; James et al., 1995). Pesquisas feitas por Sasahara & Zottola (1993) indicaram que a *Pseudomonas fragi*, considerada no experimento bactéria dominante e colonizadora primária e um representante patogênico, *Listeria monocytogenes*, juntas colonizaram e formaram biofilme na superfície de aço inoxidável e vidro. *L. monocytogenes* colonizou a superfície de vidro mais fortemente, quando houve a produção de exopolissacarídeo no meio e *P. fragi* estava presente na cultura. Quando as duas espécies crescem juntas, a matriz estabelecida pela *Pseudomonas* parece envolver a *Listeria* no biofilme.

Outro elemento importante no biofilme, a água, organizada dentro da estrutura do biofilme, representa 97% da matriz do mesmo. Segundo (Sutherland, 2001) a água pode entrar na cápsula das células dos microrganismos ou estar presente na forma de solvente, suas propriedades físicas são determinadas pela dissolução de solutos na cápsula; o movimento da água dentro da matriz favorece os processos de difusão. Os microrganismos não são distribuídos de maneira uniforme, sendo seu crescimento intercalado por canais de água altamente permeáveis.

Consterton et al. (1985) citam que biofilmes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* sob condições nas quais a fase aquosa, rica em nutrientes é contínua sob a superfície colonizada, têm sido utilizados como modelo para estudos. Desta maneira, células colonizadas produzem exopolissacarídeo e migram até a superfície formando pequenos grupamentos na base (ou estrutura em forma de cogumelo). Entre estas pequenas colônias, canais cheios de água são formados, constituindo sistema circulatório primitivo, distribuindo nutrientes e removendo produtos desnecessários para as comunidades do biofilme.

A matriz do biofilme proporciona troca de nutrientes orgânicos. Como muitos dos polímeros são aniônicos, podem ligar-se aos cátions e proporcionar

reserva desses nutrientes. A matriz pode funcionar como reserva de energia e carbono; normalmente os microrganismos não utilizam os exopolissacarídeos sintetizados, mas espécies heterogêneas na matriz possuem esta capacidade, alterando, assim, a composição e estrutura do biofilme (Sutherland, 2001).

Embora a maioria dos trabalhos tenha sido feita baseada em simulações laboratoriais, há evidências de que biofilmes se formem em condições de processamento (Andrade & Macêdo, 1996). Períodos prolongados de pasteurização contínua permitem que o número de *Streptococcus thermophilus* aumente durante a pasteurização pela adesão e multiplicação desse microrganismo nas placas do pasteurizador. O fluxo de leite arrasta as células superficiais que se formam nesse biofilme, elevando gradativamente as contagens de células no leite pasteurizado obtido nas últimas horas de processamento, podendo atingir 10^4 a 10^6 células/mL após um tempo de pasteurização de até 12 horas (Gândara, 1995).

Em operações diárias de laticínios, biofilmes têm sido reportados em curvas de tubulação, borrachas seladoras, juntas, correias transportadoras, chão, placas de troca de calor e seção de regeneração do pasteurizador (Oulahal et al., 2004).

A adesão e formação de biofilmes podem requerer coordenação, interações, e comunicação entre multiespécies de bactérias. Biofilmes não são simplesmente microrganismos e camadas de matéria orgânica em superfícies; eles representam um sistema biológico com um alto nível de organização onde as bactérias formam estruturas coordenadas e comunidades funcionais e, as conseqüências que essas comunidades causam nas indústrias de processamento de alimentos são substanciais (Chen, Daniel e Coolbear, 2003; Davey & O'Toole, 2000).

2.3.1 Parâmetros importantes na adesão

Diversos fatores podem influenciar a adesão de microrganismos às superfícies, começando pelas características do próprio microrganismo, do material aderente e do meio que circunda o microrganismo. Segundo Mosteller & Bishop (1993), a espécie, o meio de cultura e a concentração do microrganismo podem afetar o processo de adesão. Bactérias Gram-negativas, por exemplo, aderem-se mais facilmente. Troller (1993) cita que, no processo de adesão, são importantes o tipo do microrganismo, a força iônica e o tamanho da partícula do material. Em relação ao meio, pH, concentração de sais, compostos orgânicos, agitação, duração e temperatura de contato são importantes nesse processo. De acordo com Zottola & Sasahara (1994), também interferem na adesão a produção de exopolissacarídeos, hidrofobicidade, carga elétrica superficial, flagelo, fimbria e pili, estruturas protéicas de superfície celular do microrganismo, geralmente os pili são mais longos que as fimbrias e estão presentes em menores números (Madingan, Martinko e Parker, 2004).

A influência dos flagelos no processo de adesão gera controvérsias. Para alguns autores o flagelo contribui no transporte ativo das células bacterianas em superfície, podendo favorecer a adesão, para outros pode facilitar inicialmente a adesão de microrganismos, mas o movimento rotatório do flagelo pode, também, impedir por algum tempo esse mecanismo de aderência (Eden, 1981).

A utilização de substratos como leite e carne em estudos de adesão em superfície de aço inoxidável com *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* indicaram que essas bactérias são mais resistentes quando formam biofilmes a partir de leite como substrato, do que em caldo de carne, sendo o biofilme formado em ambos resistentes à sanitização (Wirtanen, Husmark e Matilla-Sandholm, 1996).

Energia de superfície provavelmente é a mais importante propriedade físico-química de uma superfície sólida. Quando a superfície é imersa em uma

solução aquosa, moléculas ou átomos da superfície tendem a interagir com moléculas ou átomos da solução e, os tipos de forças de interações dependem da química de ambos, sólido e líquido (Liu & Zhao, 2005). Já é bem estabelecido que a adsorção de macromoléculas solúveis como as proteínas a superfícies sólidas pode afetar a adesão da bactéria e outras células (Zottola, 1994).

Segundo Bishop et al. (1995), em tubulações, a circulação turbulenta do fluxo sobre o biofilme cria flutuações de pressão que aceleram a consolidação do mesmo. A última camada do biofilme, mais próxima ao substrato, é a que foi consolidada há mais tempo; portanto, as últimas camadas possuem a maior densidade e a menor porosidade. A afirmação vai ao encontro dos estudos de Lapidou & Rittmann (2004) que observaram biofilmes expostos a estresse elevado e flutuações turbulentas de pressão e constaram que estes podem ter maior taxa de consolidação. Observando o desenvolvimento de biofilmes em condições de fluxo, Davey & O'Toole (2000) avaliaram o efeito de perturbações em biofilmes estabelecidos e mostraram que os biofilmes eram polimórficos e estruturalmente adaptados a mudanças na disponibilização de nutrientes.

Para Speers & Gilmour (1985), tanto as células viáveis como as não viáveis, envolvem-se no processo de adesão como resultado da deposição ou adsorção físico-química entre estas e a superfície. As características físicas das células como forma e tamanho também podem exercer consideráveis influências nesse processo, já que células com propensão a se agruparem têm maior facilidade para dispersão na fase de enxágüe da limpeza. Da mesma forma, as superfícies com carga neutra como o aço inoxidável e, com características hidrofílicas, favorecem maior adesão de microrganismos.

2.3.1.1 Superfícies de adesão

As superfícies comumente usadas para processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, teflon e vidro permitem o crescimento microbiano que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes. As características macroscópicas e, particularmente microscópicas das superfícies, são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos por microrganismos alteradores ou patogênicos (Andrade, 2004).

A microtopografia da superfície pode complicar os procedimentos de limpeza, quando fendas e outras imperfeições protegem as células aderidas. O aço inoxidável resiste aos danos de impacto, mas é vulnerável à corrosão, enquanto superfícies emborrachadas são propensas à deterioração e podem desenvolver rachaduras onde as bactérias podem se acumular (Forsythe, 2002).

Ronner, Husmark e Henriksson (1990) estudaram a hidrofobicidade e adesão de esporos de *Bacillus* spp em vidro e aço inoxidável e constataram a hidrofobicidade dos esporos e sua aderência às duas superfícies mais rapidamente que as células vegetativas. Pelo fato da superfície do aço inoxidável possuir regiões completamente hidrofóbicas e ser muito utilizado na indústria de laticínios, onde o *Bacillus cereus* pode causar problemas de contaminação, uma das recomendações é que o aço inoxidável seja substituído ou passe por um tratamento para produzir uma superfície mais hidrofílica, para minimizar o risco de colonização por esporos de *B. cereus*.

2.3.2 Microrganismos envolvidos no processo de adesão bacteriana

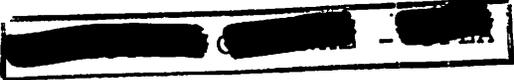
Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, estão as *Pseudomonas* spp, *Micrococcus* spp e *Enterococcus faecium* (Andrade,

Bridgeman e Zottola, 1998; Criado, Suárez e Ferrerós, 1994; Leriche & Carpentier, 1995). Como exemplos de patogênicos podemos citar, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Leriche & Carpentier, 1995; Smith & Fratamico, 1995).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as mais implicadas em processo de deterioração nas indústrias de laticínios e caracterizam-se pela morfologia de bastonetes Gram-negativos, usualmente, móveis, não formadores de esporos, apresentando alguns grupos com flagelo, em uma ou ambas as extremidades da célula. Apresentam a habilidade de fermentar um grande número de carboidratos, produzindo uma variedade de produtos que afetam as características de sabor nos alimentos. São proteolíticos e lipolíticos e sintetizam as vitaminas e fatores de crescimento necessários ao seu desenvolvimento; apresentam tendência de crescimento em aerobiose, desenvolvimento rápido e produzem substâncias oxidadas e limosidades em superfícies de alimentos, de equipamentos e utensílios para processamento de alimentos (Andrade, 2004).

2.4 Problemas ocasionados por biofilmes

Dentre os principais problemas ocasionados por biofilmes, o perigo de risco à saúde consiste no mais grave, o biofilme pode ser fonte de contaminação crônica e veicular microrganismos patogênicos. No quesito econômico, bactérias deteriorantes podem contaminar produtos alimentícios alterando suas características e levando a perdas consideráveis. Processos de corrosão também são mais facilmente desencadeados, como já foi observado em cascos de navios com biofilmes formados por bactérias marinhas. Segundo Pinto & Viana (2002), na indústria de alimentos a formação de biofilmes, ocasiona perdas econômicas significativas por deterioração dos produtos e/ou contaminação por microrganismos patogênicos. Além disso, podem ocasionar a redução da


eficiência de transferência de calor do fluxo nas tubulações e desencadear processos corrosivos em equipamentos e utensílios.

Concernente ao risco potencial à saúde humana, isto pode ser exemplificado por uma notificação feita, em julho de 2000, pelo Ministério da Saúde e Bem Estar do Japão sobre uma intoxicação alimentar envolvendo 13.890 pessoas; sendo que 180 dos casos necessitaram de hospitalização. Segundo a notificação, a intoxicação foi produzida por três diferentes marcas de leites UAT contaminados por *Staphylococcus aureus*, que foram encontrados em tubulações utilizadas em laticínios para o processamento destes leites (WHO, 2000). Uma vez aderidos à superfície das tubulações, os microrganismos apresentam uma maior resistência à ação dos sanificantes (Mosteller & Bishop, 1993). Segundo Wirtanen, Husmark e Matilla-Sandholm (1996), biofilmes de *Pseudomonas fragi*, *Enterococcus hirae*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* formados em superfícies de aço inoxidável, tratados com agentes desinfetantes a partir de diferentes produtos como hidróxido de sódio, ácido clorídrico, hipoclorito de sódio, iodóforo e amônio quaternário produzem maior quantidade de glicocálix após os tratamentos dificultando, posteriormente, a completa remoção dessas bactérias aderidas.

Parizzi (1998) cita que durante o estágio de colonização das bactérias sobre superfícies metálicas, muitas mudanças podem ocorrer entre a microcolônia e a superfície. O complexo polissacarídico presente no glicocálix pode se ligar a íons metálicos, alterando a natureza química e física do biofilme. Subprodutos metabólicos, como ácidos orgânicos, podem ser encontrados na matriz e resultar em corrosão local. Bower, McGuire e Daeschel (1996) mencionam que sérios problemas ocorrem quando tubulações são corroídas em função da formação de biofilmes. A influência microbiológica na corrosão começa quando a bactéria adere consumindo o oxigênio perto da superfície do metal, fazendo com que a área embaixo da colônia seja exposta à fase de

oxigenação. Os orifícios podem ocorrer como resultado da circulação de elétrons ao longo da superfície do metal para estes locais oxigenados.

Biofilme não é considerado somente risco higiênico na indústria de alimentos, mas também causa perdas econômicas. Qualquer método de prevenção para *biofouling* ou *lengthening* durante o processamento trará redução de custos substanciais (Zhao & Liu, 2005).

2.5 Métodos de detecção e quantificação de biofilmes

Os métodos para detecção e quantificação de biofilmes podem ser divididos em dois grupos, os métodos visuais e métodos não visuais. Como métodos visuais enquadram-se as microscopias de contraste de fase, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV), de transmissão (MET) e confocal de força atômica. A microscopia de contraste é recomendada para acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real, numa superfície transparente. A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa excelente na quantificação de células aderidas às superfícies. Para visualizar a adesão bacteriana, usam-se substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina. Com o uso deste corante, as bactérias que são viáveis fluorescem de laranja e as que fluorescem de verde são inviáveis, logo, no processo de contagem consideram-se apenas as células que fluorescem de laranja ou laranja avermelhado. A microscopia eletrônica de varredura é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme. A fixação das amostras é realizada utilizando agentes químicos, como glutaraldéido, o paraformaldeído e o ósmio ou crio-fixadas, onde a amostra é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (Alves, 2004; Costa, 1999).

Os métodos não visuais aplicados à avaliação de aderência bacteriana e formação de biofilmes são as medidas da impedância, bioluminescência e esfregaço em superfície por *swab* convencional. Segundo Rule (1997), a medida

de impedância baseia-se no princípio de que, ao se metabolizarem os componentes presentes num meio de cultura, os microrganismos transformam moléculas grandes em pequenas que possuem cargas elétricas, o que leva à mudança da resistência ou impedância do meio, a mudança da condutividade pode ser medida, e o número de microrganismos aderidos à superfície está relacionado com o valor obtido para a condutividade.

A técnica de bioluminescência é baseada no conteúdo de ATP (trifosfato de adenosina) que é gerado pela oxidação de moléculas alimentares, tais como glicose, ácidos graxos e aminoácidos. A quantidade de ATP em uma amostra pode ser medida por uma reação de bioluminescência entre a luciferina e a enzima luciferase. A quantidade de luz emitida pode ser medida por luminômetro, fluorímetro ou espectrofotômetro de cintilação líquida. Na área de alimentos, a contagem de microrganismos viáveis por essa técnica sofre interferência do ATP intrínseco, ou seja, aquele presente em outras células. Alimentos como carne fresca, leite e pescado têm grande quantidade de ATP não microbiano, sendo necessário que esse ATP seja eliminado, para utilização do método. Geralmente, utiliza-se a substância química "apirase", extraída da batata, que possui a capacidade de hidrolisar o ATP extracelular, sem interferir no ATP microbiano, que é intracelular (Franco & Landgraf, 1996).

Técnica mais convencional de detecção e contagem de microrganismos, o esfregaço em superfície pelo *swab*, permite a determinação do biofilme e contagem dos microrganismos viáveis em meio de cultura sólido, após inoculação e incubação. A coleta é realizada em espaço pré-determinado, permitindo o resultado em UFC/cm².

2.6 Higienização na indústria de laticínios

Diversas ferramentas de garantia da qualidade têm sido utilizadas na intenção de oferecer produtos seguros e, em todas elas, o que se tem de mais

concreto e recomendado são os procedimentos de higienização, como por exemplo, os PPHO (Procedimentos Padrão de Higiene Operacional) e os POP (Procedimentos Operacionais Padronizados), base para as BPF (Boas Práticas de Fabricação) e sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). No entanto, é muito comum ver estes procedimentos sendo negligenciados ou, simplesmente, mal conduzidos. De acordo com Hilbert, Bagge-Ravn e Gramb (2003) a maior parte dos programas de pré-requisitos (BPF) de plantas de processamento de alimentos é, praticamente, para assegurar que biofilmes não sejam formados ou que sejam eficientemente removidos.

Em virtude da demanda de mercado, Andrade & Brabes (2003), colocam que as indústrias de alimentos têm processado quantidade cada vez maior de produtos e, o aumento da produção pode refletir em baixa qualidade sanitária. A higienização é utilizada com o objetivo de preservar a qualidade microbiológica dos alimentos, pelo controle e prevenção da formação de biofilmes, auxiliando na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo risco à saúde do consumidor. Separada em duas etapas bem distintas, a higienização ocorre primeiro com a limpeza que, tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos à superfície, constituídos principalmente por proteína, gorduras e sais minerais; e, depois, a sanitização, para eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de alteradores em níveis aceitáveis. Entretanto, autores têm mostrado que algumas bactérias podem permanecer na superfície de equipamentos após procedimentos padrão de limpeza e sanitização.

Os tipos de limpeza existentes são adequados às naturezas das operações numa indústria de alimentos: o tipo de resíduo, de superfície, o sistema utilizado (COP ou CIP) a qualidade da água, mão-de-obra e os tipos de contaminações. Alguns autores consideram COP (Clean-out-of-Place) o que não se enquadra em

CIP (Clean-in-Place), já para outros é mais uma forma de limpeza, assim como as limpezas a jato, por imersão, por espuma ou gel, por nebulização, manual entre outras.

Segundo Andrade & Macêdo (1996), o sistema CIP ou higienização por circulação é um método automatizado e permanente, onde os equipamentos e tubulações são higienizados sem desmontagem. A partir de tanques com soluções de limpeza, substâncias ácidas ou alcalinas são bombeadas a temperaturas elevadas sendo a ação mecânica obtida pela interação com os resíduos. Pode ser usado para linhas completas ou etapas do processamento, sendo aplicado a tubulações, pasteurizadores, tanques, silos, entre outros. Este processo permite controle eficiente do fluxo, concentração, temperatura e tempo de contato, diminui custos com mão-de-obra e evita desperdícios, tornando o sistema mais econômico, porém, o custo inicial é mais elevado. Não é indicado para todo tipo de operação e não permite ação física adicional para remoção de resíduos mais difíceis.

O procedimento da limpeza CIP é geralmente recomendado pelo fabricante do equipamento e ou empresa fabricante dos produtos químicos. Segundo Andrade & Macedo (1996), a higienização completa envolve cinco etapas: pré-lavagem com água morna em torno de 40 °C, em que 90% dos resíduos solúveis em água são removidos; lavagem com soluções alcalinas que é feita diariamente; aplicação de soluções ácidas, efetuada quando há possibilidade de formação de incrustações minerais, normalmente utilizados em laticínios de duas a três vezes por semana; enxágüe completo; aplicação da solução sanitizante e enxágüe se necessário.

A limpeza em tubulações de laticínios envolve vários passos: pré-enxague com água para a remoção de resíduos grosseiros; circulação de detergente alcalino; enxágüe; circulação de detergente ácido e novo enxágüe. Segundo Damerow (1993), a eficiência dessa limpeza depende do sincronismo

de fatores envolvidos tais como: característica química e concentração dos agentes de limpeza, efeito mecânico na execução do processo, temperatura e tempo utilizados, além das características da água, associado à seqüência de etapas que envolvem esse procedimento. Limpeza é fenômeno complexo no qual a eficiência depende, além de qualquer outro critério, do efeito hidrodinâmico.

2.7 Detergentes

A eficiência do procedimento de limpeza é fundamental no controle de microrganismos aderidos, uma vez que, limpezas inadequadas podem interferir na ação de sanitizantes, dificultando a eliminação das bactérias remanescentes aderidas nas superfícies de equipamentos de alimentos, servindo como fonte de contaminação em processamentos subseqüentes (Czechowski, 1990).

A função dos detergentes, num procedimento de limpeza é, principalmente, eliminar a matéria orgânica protéica e gordurosa e, mesmo as inorgânicas como minerais, que estejam aderidas à superfície. Diferentes tipos de detergentes podem ser utilizados, como os sais alcalinos e os álcalis, ácidos, tensoativos, polifosfatos, detergentes-sanitizantes entre outros. A composição desses detergentes varia muito, conseqüentemente suas propriedades também, as quais são influenciadas por fatores como: pH, temperatura, tempo e presença de substâncias orgânicas. A resistência dos microrganismos a esses agentes, geralmente depende da espécie e cepa dos organismos envolvidos (Robinson, 1987 citado por Gândara, 1995).

Segundo Krysinski et al. (1992) a limpeza química utilizando diferentes tipos de detergentes, entre eles detergente alcalino clorado, detergente alcalino, peróxido alcalino, detergente aniônico e a limpeza biológica por detergentes enzimáticos, são eficientes somente na remoção de organismos aderidos à superfície de aço inoxidável, o mesmo não ocorrendo em superfície de poliéster/poliuretano, onde nenhum detergente foi efetivo, quando utilizado

sozinho, havendo necessidade do uso de sanitização para uma remoção adequada.

✧ Para Andrade & Macêdo (1996), as funções de detergente ideal compreendem algumas características como: saponificação, emulsificação, molhagem, penetração, suspensão, enxaguagem, abrandamento, solubilização de minerais, solubilidade, corrosividade e segurança. Porém, não existe nenhuma substância química que apresente todas essas funções juntas. Dos produtos disponíveis usados para limpeza encontram-se os alcalinos, os fosfatos, os ácidos, os complexantes e os tensoativos.

2.7.1 Detergentes alcalinos

✧ São utilizados para remover gorduras e proteínas. Na remoção de lipídeos, o íon hidroxila liberado pelos alcalinos, saponifica os ácidos graxos, formando sabão, que é solúvel em água. A ação sobre as proteínas é basicamente pelo pH, no ponto isoelétrico as proteínas possuem carga elétrica neutra e, nesse caso, os resíduos protéicos estão insolúveis em água. Quando o pH se eleva os resíduos passam a ter carga elétrica negativa, causando uma repulsão entre eles, mantendo-os em solução aquosa onde serão arrastados pela enxaguagem. Entre os agentes utilizados estão: hidróxido de sódio, carbonato de sódio, tetraborato de sódio, metassilicato de sódio, entre outros.

✧ Segundo Andrade & Macêdo (1996), o hidróxido de sódio tem o maior teor em alcalinidade sódica, apresentando pH próximo de 13, quando a 1% e possui as seguintes características: ótima ação contra gorduras e proteínas, baixa ação de molhagem, nenhuma eficácia para eliminar a dureza, poder corrosivo muito forte contra alumínio, cobre e superfícies galvanizadas e não ataca o aço inoxidável.

2.7.2 Detergentes ácidos

As soluções ácidas são produtos compostos de ácidos orgânicos ou inorgânicos que podem ser usados individualmente ou em combinações. A principal função dessas soluções no procedimento de higienização é a de prevenir e remover incrustações minerais. A eficiência dos ácidos como detergentes, e seu poder corrosivo, atuam de maneira paralela, já que ambos dependem da concentração do íon hidrogênio (Andrade & Macedo, 1996). Dentre os principais agentes ácidos orgânicos estão: ácido láctico, glucônico, cítrico, tartárico e acético; dos inorgânicos podem ser citados: ácido sulfúrico, clorídrico, sulfâmico, fosfórico e nítrico.

2.7.3 Detergentes enzimáticos

As enzimas têm como propriedade promover transformações específicas em outras substâncias bioquímicas pela decomposição de estruturas moleculares complexas em estruturas simples que podem ser dissolvidas produzindo um substrato mais fácil de ser removido pelos agentes de limpeza, tornando mais efetiva a ação dos mesmos, contudo, é necessário ressaltar que a enzima não é um agente de limpeza, mas contribui para sua efetivação quando associada ao detergente.

Segundo Argüello et al. (2005), há algum tempo, proteases têm sido bastante utilizadas como ingrediente de detergentes enzimáticos. A idéia de acrescentar enzimas a detergentes vem desde 1913, naquele tempo somente enzimas pancreáticas eram disponíveis e não eram conhecidos métodos físicos para boa conservação, com isso, a durabilidade e eficiência ficavam comprometidas. O desenvolvimento de enzimas de origem bacteriana começou em 1950 com a produção do BIO40; esta formulação possuía protease bacteriana, um grande avanço comparado à precursora pancreática. Nos anos 70 a nova geração de detergentes enzimáticos passou por diferentes formas físicas

(em pó, pílulas e encapsulados). Em 1988, a moderna tecnologia de DNA recombinante produziu Lipolase TM. No entanto, as proteases ainda são a maioria nos detergentes, junto com amilases, celulasas e lipases.

Agentes enzimáticos podem apurar a eficiência da limpeza e ainda reduzir a quantidade de produtos químicos empregados e o custo com energia, pois trabalham a baixas temperaturas. Além disso, são biodegradáveis e a preparação pode ser feita sem maiores cuidados pelos manipuladores.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**. Lavras: Editora UFLA, 1999. 215 p. (Textos acadêmicos).

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43 p.

ANDRADE, N. J. Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios. In: WORKSHOP SOBRE DESENVOLVIMENTO NO SETOR LEITE, 2., 2004, Viçosa. **Anais....** Viçosa: UFV, 2004. 14 p.

ANDRADE, N. J.; BRABES, K. C. S. Procedimentos de higienização e biofilmes microbianos na indústria de alimentos. In: MENDONÇA, R. C. S.; BRABES, K. C. S.; OLIVEIRA, K. A. M.; VIEIRA, E. N. R. **Microbiologia de alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**: Viçosa, 2003. p. 145-160.

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

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Ed. Livraria Varela, 1996. 182 p.

ARGÜELLO, M. A.; ALVAREZ, S.; RIERA, F. A.; ALVAREZ, R. Utilization of enzymatic detergents to clean inorganic membranes fouled by whey proteins. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 147-154, Feb. 2005.

BEECH, W. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metal. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 3, p. 181-186, June 2004.

BENDICHO, S.; BARBOSA-CANOVAS, G. V.; MARTIN, O. Reduction of Protease Activity in Milk by Continuous Flow High-Intensity Pulsed Electric Field Treatments. **American Dairy Science Association. Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 697-703, 2003.

BISHOP, P.L.; RITTMANN, B. E. Modelling heterogeneity in biofilms: Report of the discussion session . Short communication **Water Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 263-265, 1995

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

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinari Medicina**, Prague, v. 47, n. 8, p. 227-233, p. 2002. Aug.

CHAPON-HERVE, V.; AKRIM, M.; LATIFI, A.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M. Regulation of xcp secretion pathway by multiple quorum sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 1169-1178, June 1997.

CHARACKLIS, W. G. Biofilm development: a process analysis. In: MARSHALL, K. C. (Ed.). **Microbial adhesion and aggregation**. New York: Springer Verlag, 1984. 227 p.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

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

COSTERTON, J. W.; MARRIE, T. J.; CHENG, K. J. Phenomena of bacterial adhesion. In: SAVAGE, D. C.; FLETCHER, M. (Ed.). **Bacterial Adhesion**. London: Plenum Press, 1985. p. 3-43.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic micro-organisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, p. 172-207, 1982.

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. 1. Identification of types. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 47, n. 1, p. 38-45, 1992.

CRIADO, M. T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 123-126, Feb. 1994.

DAMEROW, G. The hygienic design of dairy plants and the limits to continuous processing. **Bulletin International Dairy Federation**, Brussels, v. 279, p. 38-44, Oct. 1993.

CZECHOWSKI, M. H. Use of biocides to control biofilms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 10, p. 901-905, Oct. 1990.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 4, p. 847-867, Dec. 2000.

DEETH, H. C.; TOUCH, V. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 55, n. 3, p. 153-168, Oct. 2000.

DUNSTALL, G.; ROWE, M. T.; WISDOM, G. B.; KILPATRICK, D. Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of *Pseudomonas* spp. of raw milk origin. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 45, n. 3, p. 276-280, 2005.

EDEN, R. F. Attachment of bacteria to meat surfaces: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, n. 8, p. 602-607, Aug. 1981.

ERLANDSEN, S. L.; KRISTICH, C. J.; DUNNY, G. M. Ultrastructure of *Enterococcus faecalis* biofilms. **Biofilms**, Bozeman, n. 1, p. 131-137, 2004.

FORSYTHE, J. F. **Microbiologia da segurança alimentar**. : São Paulo: Ed. ArtMed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 182 p.

GÂNDARA, A. L. N. **Características de crescimento de uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus*, sua adesão em superfície de aço inoxidável e comportamento frente a detergência e sanificação**. 1995. 75 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

- GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 245-248, 2003.
- GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D. The application of the pre-incubation test in commercial dairies. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 41, n. 2/3, p. 71-79, June 1986
- HILBERT, L. R.; BAGGE-RAVN, D.; KQLD, J.; GRAMB, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 175-185, 2003.
- JAMES G. A.; BEAUDETTE, L.; COSTERTON, J. W. Interspecies bacterial interactions in biofilms. **Journal of Industrial Microbiology**, Hants, v. 15, n. 4, p. 257-262, Oct. 1995.
- JAYARAO, B. M.; WANG, L. A Study on the Prevalence of Gram-Negative Bacteria in Bulk Tank Milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 12, p. 2620-2624, Dec. 1999
- JASPE, A.; OVIEDO, P.; FERNANDEZ, L.; PALÁCIOS, P.; SANJOSE, C. J. Cooling of raw milk: change in the spoilage potential contaminating *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 8, Aug. p. 915-921, 1995
- KRYSINSKI, E. P.; BROWN, L. J.; MARCHISELLO, T. J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 4, p. 246-251, Apr. 1992.
- LASPIDOU, C. S.; RITTMANN, B. E. Modeling biofilm complexity by including active and inert biomass and extracellular polymeric substances. **Biofilms**, Bozeman, n. 1, p. 285-291, 2004
- LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single and binary biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 11, p. 1186-1191, Nov. 1995.
- LIU, Y.; ZHAO, Q. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 37-43, Apr. 2005.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. 2004. 608 p.

MAFU, A. A.; ROY, D.; COULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. **Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 9, p. 742-746, Sept. 1990.

MARTINS, M. L.; ARAÚJO, E. F.; MANTOVANI, H. C.; MORAES, C. A.; VANETTI, M. C. D. Detection of the *apr* gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 203-211, July 2005.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 59-62, May 1999.

MATTA, H.; PUNJ, V. An immunoassay for detection of heatstable proteases from thermophilic psychrotrophic *Bacillus* spp. of dairy origin. **Microbiological Research**, Oxford, v. 155, n. 3, p. 197-203, Mar. 2000.

MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 1, p. 34-41, Jan. 1993.

OULAHAL, N.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M.; BLUM, L. J. Combined effect of chelating agents and ultrasound on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to “*Escherichia coli* milk” and “*Staphylococcus aureus* milk” biofilms. **Biofilms**, Bozeman, n. 1, p. 65-73, 2004.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas**. 1998. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PINK, J.; SMITH-PALMER, T.; BEVERIDGE, T. J.; PINK, D. A. An FTIR study of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm growth and dispersion. An improved ATR method for studying biofilms: the C–H stretch spectral region. **Biofilms**, Bozeman, n. 1, p. 157-163, 2004.

PINTO, C. L. O.; VIANA, E. S. Higiene na indústria de laticínios. In: WORKSHOP - GARANTIA DA QUALIDADE E HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 1., 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2002. p. 23-48.

ROBINSON, R. K. **Microbiologia lactologica: microbiologia de la leche.** Zaragoza: Editora Acribia, 1987. v. 1, 230 p.

RONNER, U.; HUSMARK, U.; HENRIKSSON, A. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 551-556, Oct. 1990.

RULE, P. Measurement of microbial activity by impedance. In: TORTORELLO, M. L.; GENDEL, S. M. **Food microbiological analysis: new technologies.** 1997. Cap. 16, p. 315-343. (IFT basica symposium series).

SALMOND, G. P. C.; BYCROFT, B. W.; STEWART, G. S. A. B. ; WILLIAMS, P. The bacterial "enigma": cracking the code of cell-cell communication. **Molecular Methods**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 615-624, May 1995.

SCHRÖDER, M. J. A. Origins and levels of post pasteurization contamination of milk in dairy and their effects on keeping quality. **Journal Dairy Research**, Cambridge, v. 51, n. 1, p. 59-67, Feb. 1984.

SMITH, J. L.; FRATÂMICO, P. M. Factores involved in the emergence and persistente of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 6, p. 696-708, June 1995.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 35-40, Feb. 1997.

SPEERS, J. G. S.; LEWIS, S. J.; GILMOUR, A. Bacteriological sampling of glass, rubber and stainless steel pipe sections. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 51, p. 547-555, 1984.

SUAREZ, B.; FERRERÓS, C. M. Psychrotrophic flora of raw milk: resistance to several common disinfectants. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 58, n. 1, p. 127-136, Feb. 1991.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, London, v. 9, n. 5, p. 222-227, May 2001.

TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. 2. ed. San Diego: academic Press, 1993. 478 p.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Austrália, 2000. Disponível em: <<http://www.health.gov.au/pubhlth/cdiht.htm>>. Acesso em: 28 abr. 2005.

ZHAO, Q.; LIU, Y. Modification of stainless steel surfaces by electroless Ni-P and small amount of PTFE to minimize bacterial adhesion. **Journal of Food Engineering**. 2005, Disponível: www.periodicos.capes.gov.br .Acesso 21 de julho de 2005

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry ? **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, July 1994.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International Food Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 125-148, Oct. 1994.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE QUALIDADE DO LEITE E SEU COMPROMETIMENTO PELO PROCESSO DE ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS

RESUMO

RIBEIRO-FURTINI, Larissa Lagoa. Quantificação da microbiota e isolamento de *Pseudomonas* spp em tubulação de laticínio após limpeza alcalina e ácida. In: **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência.** 2005.Cap.2, p.38-51 . Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras e teve como objetivos quantificar e caracterizar a microbiota presente em tubulação de laticínio que pasteuriza leite B na região de Lavras, após limpeza alcalina e ácida, permitindo, assim, avaliação da eficácia do processo. A amostragem foi feita pela técnica do esfregaço em cinco locais de possível formação de biofilme, da saída do pasteurizador até a empacotadeira. O local 4 (entrada da empacotadeira) apresentou o mesmo número para mesófilos e psicrotróficos: $1,6 \times 10^5$ UFC/cm². No local 5 (saída da empacotadeira) foram obtidos valores de $2,7 \times 10^5$ e $2,9 \times 10^5$ UFC/cm², respectivamente, para mesófilos e psicrotróficos e estes resultados só permitem afirmar processo de adesão e não de formação de biofilme. Vinte e oito isolados foram escolhidos e submetidos à identificação. Procederam-se a testes preliminares como Coloração de Gram, O/F, oxidase e crescimento em MacConkey antes de utilizar o Api 20E. Durante o isolamento bastonetes Gram-negativos foram os microrganismos predominantes; dos 28 isolados 21 apresentaram esta morfologia e característica. No teste para psicrotróficos, 19 apresentaram crescimento a 7 °C e dentre esses, 10 foram identificados como *Pseudomonas* spp, microrganismo produtor de enzimas termoestáveis, que pode causar alterações em leite e seus derivados. O reconhecimento do processo de adesão e a observação visual do *swab* com resíduos orgânicos levam a acreditar que a limpeza com detergente alcalino e ácido não é efetiva.

* Comitê orientador: Prof. Luiz Ronaldo de Abreu - PhD (orientador)- UFLA, Prof^a Dr. Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA, Prof. Dr. Nélio José de Andrade – UFV .

ABSTRACT

RIBEIRO-FURTINI, Larissa Lagoa. Quantification of the microbiota of *Pseudomonas sp* in dairy plant pipeline after alkaline and acidic cleaning. In: **Characterization and isolation of microorganisms adhered to dairy plant pipeline and their behavior against detergency**. 2005. Cap.2 38-51. Thesis (Doctorate in Food Science). Federal University of Lavras, Lavras, MG.

This work was developed in the Microbiology Laboratory of the Food Science Department of the Federal University of Lavras and was intended to quantify and characterize the microbiota present in pipeline of a dairy plant which pasteurizes type B milk in the region of Lavras-MG, after alkaline and acidic cleaning, enabling in this way, evaluation the efficacy of the process. The sampling was done by the scrubbing technique on five spots of possible biofilm formation, from the pasteurizer outlet to the packaging system. Spot 4 (entrance to packaging) presented the same number of mesophylics and psychrotrophics: 1.6×10^5 CFU/cm². At spot 5 (exit of packaging), values of 2.7×10^5 and 2.9×10^5 CFU/cm², respectively were obtained for mesophylics and psychrotrophics and, these results only enable to confirm a adhesion process and not a biofilm formation. Twenty-eight isolates were chosen and submitted to identification. Previous tests were proceeded as Gram, O/F, oxidase, catalysis and growth on MacConkey before utilizing Api 20E. During the isolation, Gram –negative rods were the predominant microorganisms, out of the 28 isolates 21 presented this characteristic. In the test for psychrotrophics, 19 presented growth at 7 °C and among those, 10 were identified as *Pseudomonas sp*, heat stable enzyme-producing microorganisms, which can cause alterations in milk and dairies. The recognizing of the adhesion process and the visual observation of the swab with organic residues lead on to believe that cleaning with alkaline and acidic detergent is not effective.

* Guidance Committee: Prof. Luiz Ronaldo de Abreu -PhD (Adviser) – UFLA, Prof^a Dr^a. Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA and Prof. Dr. Nélío José de Andrade – UFV.

1 INTRODUÇÃO

Nas indústrias de laticínios, pela própria natureza de suas operações, acumulam em superfícies de equipamentos e utensílios, sujidades e resíduos que devem ser eliminados. A aplicação correta dos procedimentos de higiene, limpeza e sanitização previnem a ocorrência das enfermidades transmitidas por alimentos e a deterioração do alimento de forma a preservar suas características.

Procedimentos inadequados de higienização dos equipamentos e a microbiota contaminante do ambiente de processamento são considerados as principais causas de contaminação do leite e seus derivados, com a peculiaridade destes produtos apresentarem substrato excelente para a proliferação bacteriana. Segundo Pinto & Viana (2002), a adesão microbiana e conseqüente formação de biofilmes à superfície de equipamentos utilizados para o processamento de alimentos, resulta em graves problemas para a indústria, ocasiona perdas econômicas significativas por deterioração dos produtos e/ou contaminação por microrganismos patogênicos.

Biofilme microbiano é uma massa composta por resíduos, microrganismos e seus catabólitos e possui o potencial de atuar como fonte crônica de contaminação. Vários tipos de microrganismos, patogênicos e/ou deteriorantes, são capazes de aderir a superfícies comumente encontradas em ambientes de processamento de alimentos. Na indústria de laticínios, o aço inoxidável é amplamente utilizado por ser mais resistente à corrosão e a altas temperaturas e por ser de fácil higienização. No entanto, vários estudos mostram processos de adesão e formação de biofilmes nesta superfície.

Quando presentes em biofilmes, a resistência dos microrganismos aumenta significativamente, dificultando a ação de detergentes e sanitizantes. Essa microbiota variada cresce numa ampla faixa de temperatura incluindo desde microrganismos termófilos até psicrotóxicos. O último grupo representa

crescente preocupação, principalmente após a adoção da coleta de leite a granel, uma vez que o uso intensivo de refrigeração do leite da fazenda até a mesa do consumidor, acaba por selecioná-lo.

Os psicrotróficos mais comuns no leite são bastonetes curtos, Gram-negativos e não-esporulantes, sendo a maioria composta pelos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Acinetobacter*. Os psicrotróficos deteriorantes, como *Pseudomonas* spp, *Alcaligenes* spp, *Enterobacter* spp, *Bacillus* spp, entre outros, produzem enzimas termoestáveis como lipases e proteases que causam alterações no leite fluido e seus derivados, produzindo defeitos relacionados à degradação, à coagulação em leite UAT e à redução do rendimento de queijos, levando a prejuízos consideráveis. Esses microrganismos são constantemente implicados em processos de adesão e constituição de biofilmes, cujas formações são favorecidas, pois o leite é excelente meio de crescimento microbiano.

A limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios têm grande importância para as indústrias de alimentos no que se refere à prevenção e ao controle da adesão microbiana e formação de biofilmes. Se a limpeza não for realizada adequadamente, os sanitizantes podem ter a sua eficiência reduzida. A conveniência de conhecer a microbiota predominante em superfícies a serem higienizadas permite melhor desígnio de agentes químicos.

Com o objetivo de avaliar a eficiência da limpeza alcalina e ácida de tubulação de laticínio que pasteuriza leite B foram amostrados locais de possível formação de biofilme e caracterizada e quantificada a microbiota predominante de mesófilos e psicrotróficos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta

Em laticínio da região de Lavras que realiza sistema de limpeza CIP e utiliza, respectivamente, como detergente alcalino e ácido o hidróxido de sódio e ácido nítrico, ambos à concentração de 1%, foram retiradas amostras ao longo da tubulação em cinco locais depois da saída do pasteurizador até a empacotadeira.

- Local 1: saída do pasteurizador
- Local 2: primeira curva ou “joelho” após o pasteurizador
- Local 3: painel de distribuição de leite
- Local 4: entrada da empacotadeira
- Local 5: saída da empacotadeira

A coleta de amostras foi realizada pela manhã, após limpeza alcalina e ácida do dia anterior e imediatamente antes da sanitização. A amostragem no interior de tubulações de aço inoxidável foi feita, utilizando-se a técnica do esfregão em superfície com *swabs* padronizados (Silva et al., 2001), em movimento espiral de dentro para fora do tubo. Para que fosse possível o cálculo em UFC/cm², a área foi delimitada em 5 cm ao longo do tubo e o diâmetro da tubulação, que modificava conforme o local, registrado. Todo o procedimento de coleta de amostras foi feito em três repetições, de 15 em 15 dias.

2.2 Análise

Aliquotas do diluente contendo os *swabs* foram diluídas, de forma seriada ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$), e inoculadas utilizando-se a técnica de plaqueamento *pour plate* com Tryptic Soy Agar (TSA) em triplicata. As placas foram incubadas a 35 °C por 24-48h e, a 7 °C por 10 dias com o objetivo de selecionar microrganismos mesófilos e psicrotróficos, respectivamente (APHA, 1992).

A média dos valores em UFC/cm² indicou o local cinco, saída da empacotadeira, como o mais contaminado para mesófilos e psicrotróficos. Foi então realizada outra coleta, somente neste local. A raiz quadrada da contagem em UFC/mL foi feita em placas selecionadas de mesófilos e psicrotróficos; vinte e oito isolados foram escolhidos pela morfologia e coloração das colônias e submetidos à identificação. Procederam-se testes preliminares como coloração de Gram, O/F (Oxidação/Fermentação), oxidase, e crescimento em MacConkey (MacFaddin, 2003) antes de utilizar o kit Api 20E (Biomeriéux) para identificação de bacilos Gram- negativos. Somente foram submetidos ao Api 20E bacilos Gram-negativos e O de O/F positiva.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o isolamento de microrganismos de tubulação de laticínio após limpeza ácida e alcalina, bastonetes Gram-negativos foram os microrganismos predominantes sendo que de 28 isolados 21 apresentaram esta morfologia e característica depois do teste de coloração de Gram. Na avaliação para psicotróficos, 19 apresentaram crescimento a 7 °C e, dentre esses, 10 foram identificados como *Pseudomonas* spp. O resultado de todos os isolados pode ser conferido no quadro 1.

QUADRO 1: Resultados de testes bioquímicos efetuados em microrganismos isolados de tubulação de laticínios.

| Cepa | Gram | Oxidase | O/F | MacConkey | Psic/Meso | Api 20E |
|------|------|---------|-----|-----------|-----------|------------------------|
| 1 | B- | + | O | + | M | Sem resultado |
| 2 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 3 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 4 | B- | + | O | + | M | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 5 | B- | + | O | + | M | Sem resultado |
| 6 | B+ | - | F | - | M | Não realizado |
| 7 | C- | - | F | - | M | Não realizado |
| 8 | B- | - | F | + | P | Não realizado |
| 9 | C+ | - | F | - | M | Não realizado |
| 10 | C+ | - | F | - | M | Não realizado |
| 11 | B- | - | O | + | P | Sem resultado |
| 12 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 13 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |

Continua.....

Continuação do quadro 1: Resultados de testes bioquímicos efetuados em microrganismos isolados de tubulação de laticínios.

| Cepa | Gram | Oxidase | O/F | MacConkey | Psic/Meso | Api 20E |
|------|------|---------|-----|-----------|-----------|---------------------------------|
| 14 | C- | + | O | - | P | Não realizado |
| 15 | B- | + | O | + | M | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 16 | B- | - | O | + | P | <i>Flavimonas oryzihabitans</i> |
| 17 | B- | - | F | + | P | <i>Acinetobacter</i> spp |
| 18 | C+ | - | F | - | P | Não realizado |
| 19 | B- | - | F | + | P | Não realizado |
| 20 | B- | - | F | + | P | Não realizado |
| 21 | B+ | - | O | - | M | Não realizado |
| 22 | B- | + | - | + | P | Sem resultado |
| 23 | B- | - | F | + | P | Não realizado |
| 24 | B- | - | F | + | P | Não realizado |
| 25 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 26 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 27 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |
| 28 | B- | + | O | + | P | <i>Pseudomonas</i> spp |

Jayarao & Wang (1999) observaram grande variedade de bactérias Gram-negativas entre os isolados. Duzentos e trinta e quatro isolados de tanque de expansão de leite foram examinados até espécie; duzentos e cinco pertenciam a 28 espécies e um total de 116 isolados de *Pseudomonas* foram originados do leite cru. Destes 98 isolados pertenciam a 9 espécies de *Pseudomonas* e os outros 18 não forneceram resultados até espécies. *Pseudomonas* foi o gênero

mais isolado e *Pseudomonas fluorescens* a espécie predominante em tanque de expansão perfazendo um total de 29,9% de todos os isolados. O autor ressalta que bactérias Gram-negativas de importância para saúde pública como *Campylobacter*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* e *Yersinia*, apesar de terem sido presentes em uma menor porcentagem de isolados em tanque de expansão, vêm sendo incriminadas em casos severos de surtos ou doenças veiculadas ao leite pelo consumo de leite cru.

Segundo Zottola (1994) contagens entre 10^5 e 10^6 UFC/cm² caracterizam uma adesão bacteriana enquanto contagens entre 10^6 e 10^7 indicam a formação de um biofilme.

Os valores obtidos neste estudo permitem afirmar adesão, cuja capacidade de biotransferência também é preocupante.

Conforme Quadro 2, dos cinco locais amostrados, dois indicaram média de valores expressiva ($>10^4$); o local quatro apresentou o mesmo número para mesófilos e psicotróficos: $1,6 \times 10^5$ cm². No local cinco foram obtidos valores de $2,7 \times 10^5$ cm² e $2,9 \times 10^5$ cm² respectivamente, para mesófilos e psicotróficos.

QUADRO 2: Log do número em UFC/cm² de microrganismos mesófilos aeróbios e de psicotróficos aderidos em cinco locais de coleta em tubulação de laticínios entre as saídas do pasteurizador e empacotadeira, após limpeza alcalina e ácida.

| Microrganismos | Local | | | | |
|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Mesófilos | <10 | $2,2 \times 10^2$ | $1,0 \times 10^3$ | $1,6 \times 10^5$ | $2,7 \times 10^5$ |
| Psicotróficos | $2,2 \times 10$ | <10 | $1,7 \times 10^3$ | $1,6 \times 10^5$ | $2,9 \times 10^5$ |

O gênero predominantemente identificado no Api 20E foi *Pseudomonas* nos dois grupos, mesófilos e psicotróficos. Sorhaug & Stepaniak (1997) citam que a maioria das *Pseudomonas* que produzem enzimas como proteinases, lipases e fosforilases, pode sobreviver por um longo período em resíduos de leite, daí a importância de uma higienização eficiente. Na condução deste experimento, o reconhecimento do processo de adesão e a observação visual do *swab* com resíduos orgânicos leva a acreditar que a limpeza não está sendo efetiva.

Aaku et al. (2004) encontraram em leite cru e pasteurizado de duas plantas diferentes de processamento de leite, contagens de psicotróficos proteolíticos variando entre 10^1 e 10^5 nos dois produtos.

Eneroth et al. (1998) analisaram amostras de leite que foram retiradas de quatro pontos ao longo da linha de pasteurização: logo após o pasteurizador, no tanque pulmão de leite pasteurizado, antes da empacotadeira e embalagens seladas para consumo. As amostras antes da pasteurização apresentavam 10^4 UFC/ml de psicotrófico, e depois da pasteurização 10^2 - 10^3 UFC/mL. Para Oulahal (2004) está ficando evidente que biofilmes em tubulações contribuem para a recontaminação bacteriana em alimentos.

Deve-se ressaltar que os processos de adesão ocorrem, provavelmente, com uma frequência maior na indústria de alimentos, quando comparados à formação de biofilmes. No entanto, a adesão bacteriana é relevante no procedimento de higienização de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos, considerando que o número elevado de microrganismos nas superfícies dificultam a ação de detergentes e sanitizantes. Inclusive, já está bem estabelecido que as células aderidas apresentam maior resistência à ação dos agentes de higienização (Andrade 1996, 1998 citado por Parizzi, 1998)

4 CONCLUSÕES

O gênero *Pseudomonas* foi predominante entre os isolados nos dois grupos, mesófilos e psicrotróficos.

O local cinco (saída da empacotadeira) apresentou maior contagem para microrganismos mesófilos e psicrotróficos com média de valores de $2,7 \times 10^5/\text{cm}^2$ e $2,9 \times 10^5/\text{cm}^2$, respectivamente.

Pelo número de microrganismos encontrados, conclui-se que a limpeza alcalina e ácida deste laticínio não está sendo eficiente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKU, E. N.; COLLISON, E. K.; GASHE, B. A.; MPUCHANE, S. Microbiological quality of milk from two processing plants in Gaborone-Botswana. *Food Control*, Oxford, v. 15, n. 3, p. 181-186, Apr. 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 15. ed. Washington, 1992. 1224 p.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDEHAUG, J.; MOLIN, G. Critical Contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal*, Amsterdam, v. 8, n. 9, p. 829-834, 1998.

JAYARAO, B. M.; WANG, L. A Study on the Prevalence of Gram-Negative Bacteria in Bulk Tank Milk. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 82, n. 12, p. 2620-2624, Dec. 1999.

MACFADDIN, J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importância clínica*. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2003. 850 p.

OULAHAL, N.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M.; BLUM, L. J. Combined effect of chelating agents and ultrasound on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to "*Escherichia coli* milk" and "*Staphylococcus aureus* milk" Biofilms. *Biofilms*, Bozeman, n. 1, p. 65-73, 2004.

PARIZZI, S. Q. F. *Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas*. 1998. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PINTO, C. L. O.; VIANA, E. S. Higiene na indústria de laticínios. In: *WORKSHOP-GARANTIA DA QUALIDADE E HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS*, 1., 2002, Viçosa. *Anais... Viçosa: UFV*, 2002. p. 23-48.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: livraria Varela, 2001. 318 p;

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. Trends in Food Science and Technology, Oxford, v. 8, n. 2, p. 35-40, Feb. 1997.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry ? Food Technology, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, July 1994.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ADESÃO DE *Pseudomonas* spp MESÓFILA E PSICROTRÓFICA EM SUPERFÍCIES DE VIDRO E AÇO INOXIDÁVEL E COMPORTAMENTO FRENTE À DETERGÊNCIA

RESUMO

RIBEIRO-FURTINI, Larissa Lagoa. Avaliação do processo de adesão por *Pseudomonas* spp mesófila e psicrotrófica em superfícies de vidro e aço inoxidável e comportamento frente à detergência enzimática. In: **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência.** 2005. Cap.3 p. 52-80. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra Estrutural do Departamento de Fitopatologia, ambos na Universidade Federal de Lavras, e teve como objetivos: verificar processo de adesão *in vitro* de *Pseudomonas* spp mesófila e psicrotrófica em cupons de aço inoxidável (10x15mm) e vidro; comparar a eficiência de detergentes alcalino e ácido com detergente enzimático na redução logarítmica do processo de adesão em aço inoxidável; verificar a possibilidade de biotransferência da superfície aderida (cupons) para o meio estéril. A cepa psicrotrófica (*Pseudomonas* spp.) com 18 horas de contato, obteve média de adesão em cupom de aço inoxidável de $4,4 \times 10^5$ UFC/cm² e em vidro de $1,7 \times 10^4$ UFC/cm². Para a cepa mesófila os resultados não permitem afirmar adesão significativa, a contagem total em UFC/cm² foi de $4,6 \times 10^3$ para a superfície de aço inoxidável e de $3,2 \times 10^2$ para o vidro. As duas cepas de *Pseudomonas* spp apresentaram diferença de adesão de dois ciclos log, tanto para a superfície de aço inoxidável quanto para a de vidro. A microscopia eletrônica de varredura permitiu visualizar a adesão de *Pseudomonas* spp psicrotrófica e mesófila na superfície dos cupons de aço inoxidável, sem formação de estruturas de adesão (formação de exopolissacarídeos). No teste da detergência, os três tratamentos: limpeza alcalina, limpeza alcalina e ácida e limpeza com detergente enzimático, não apresentaram diferença, uma vez que todos os tratamentos reduziram a <10 UFC/cm² o número de células aderidas. Houve transferência importante de *Pseudomonas* spp dos cupons aderidos para o meio circundante. Para a cepa psicrotrófica foram obtidas contagens de $5,0 \times 10^8$ UFC/mL em média e a cepa mesófila $3,2 \times 10^7$ UFC/mL ao final de 24 horas.

* Comitê orientador: Prof. Luiz Ronaldo de Abreu - PhD (orientador) - UFLA, Prof^a. Dr. Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA; Prof. Dr. Nélío José de Andrade – UFV .

ABSTRACT

RIBEIRO-FURTINI, Larissa Lagoa. Evaluation of the process of adhesion of mesophylic and psychrotrophic *Pseudomonas sp* to glass and stainless steel surface and behavior against enzyme detergency. In: **Characterization and isolation of microorganisms adhered to dairy factory pipeline and their behavior in relation to detergency**. 2005, Chap. 3. p. 52-80. Thesis (Doctorate in Food Science). Federal University of Lavras, Lavras, MG.

This work was developed in the Microbiology Laboratory of the Food Science Department and in the Electron Microscopy and Ultra Structural Analysis Laboratory of the Plant Pathology Department both in the Federal University of Lavras. The objectives were the followings: to simulate in vitro process of adhesion of mesophylic and psychrotrophic *Pseudomonas spp* in stainless steel and glass tabs (10x15 mm); to compare the efficiency of alkaline and acidic detergents with enzyme detergent in the logarithmic reduction of the process of adhesion to stainless steel; to verify the possibility of biotransference of the adhered surface (coupons) to the sterile medium. The psychrotrophic strain (*Pseudomonas spp*) with 18 hours' contact, obtained an average adhesion to stainless steel of 4.4×10^5 CFU/cm² and, to glass of 1.7×10^4 CFU/cm². For the mesophylic strain, the results did not enable identify a significant adhesion, the total count in CFU/cm² was of 4.6×10^3 for the stainless steel surface and of 3.2×10^2 for glass. The two strains of *Pseudomonas spp* showed adhesion of differences of 2 log cycles both for the stainless steel and glass surface. Scanning electron microscopy enable to view the adhesion of mesophylic and psychrotrophic *Pseudomonas spp* to the surface of the stainless steel coupons with no formation of adhesion structures (formation of exopolysaccharides). In the test of detergency, the three treatments: alkaline cleaning, alkaline and acidic cleaning and cleaning with enzyme detergent showed no difference since all the treatments reduced to zero the number of adhered cells. There was an important transfer of *Pseudomonas spp* from the adhered tabs to the surrounding medium. For the psychrotrophic strain, counts of 5.0×10^8 CFU/mL and for the mesophylic strain, 3.2×10^7 CFU/mL at the end of 24 hours were obtained.

* Guidance Committee: Prof. Luiz Ronaldo de Abreu -PhD (Adviser) – UFLA, Prof^a Dr^a. Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA and Prof. Dr. Nélio José de Andrade – UFV.

1 INTRODUÇÃO

Nas indústrias de alimentos, em especial a de laticínios, o ambiente é propenso à contaminação e proliferação de microrganismos, devido à riqueza de nutrientes da matéria-prima. Uma das causas de contaminação e incidência de microrganismos alteradores e patogênicos é sua adesão e interação com as superfícies de equipamentos ou utensílios que entram em contato com alimentos durante o processo de industrialização, muitas vezes ocasionados por falhas na higienização.

A adesão dos microrganismos às superfícies (aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica; propileno, ferro forjado, etc), multiplicação e formação de massa celular suficientemente grande, capaz de agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, pode ser definido como biofilme (Mafu, 1990; Krysinsky et al., 1992). O que diferencia a adesão microbiana do biofilme é o número de células aderidas, entre 10^5 e 10^6 células por cm^2 configura-se adesão e o biofilme acima de $10^7/\text{cm}^2$.

Diversos fatores podem influenciar na adesão e formação de biofilmes, começando pelas características e concentração do próprio microrganismo, tipo de superfície e nutrientes disponíveis no meio, temperatura, pH, tempo de contato entre outros. Uma das superfícies mais utilizadas nas indústrias de alimentos é o aço inoxidável, por possuir entre outras qualidades, a facilidade para higienização e resistência à corrosão.

Segundo Kumar e Anand (1998) alguns estudos mostram que não há diferença significativa de higienização de superfícies em uso como aço inoxidável, vidro, náilon e compostos de polivinil quando novas. Porém, com tempo de uso, o aço inoxidável apresentou melhor propriedade higiênica.

Vários são os microrganismos que podem participar de processo de adesão e formação de biofilmes, deteriorantes ou patogênicos, quando presentes em biofilmes apresentam resistência maior a agentes químicos e podem servir de fonte crônica de contaminação. Associados a problemas em laticínios, microrganismos psicrotróficos, que incluem espécies com tempo de geração curto em temperaturas entre 0 °C a 7 °C, em especial os do gênero *Pseudomonas*, são as bactérias mais comumente isoladas em processo de adesão ou biofilme. Apesar de não serem resistentes aos tratamentos térmicos comumente empregados nestes produtos, produzem enzimas termoestáveis como lipases e proteases com grande capacidade de regeneração, que provocam entre outros defeitos, sabores e odores estranhos, perda de rendimento em queijos e gelificação em leite UAT (Ultra Alta Temperatura)

Particularmente, em laticínios que trabalham com a limpeza CIP (Clean in Place), em qualquer etapa do processamento, o contato por abrasão física não é possível, dificultando o processo de remoção mecânica do biofilme. A maioria das ferramentas para garantia da qualidade opera, basicamente, com a higienização das indústrias de alimentos, em que o objetivo é necessariamente evitar e remover biofilmes.

Além disso, vários pesquisadores sugerem a prevenção da adesão já que esta é reversível e configura pré-requisito para formação do biofilme. Produtos para limpeza e sanitização têm sido lançados no mercado e, entre eles, o detergente enzimático aparece como boa alternativa, por ser menos corrosivo e menos agressivo aos manipuladores e meio-ambiente.

Objetivos do estudo:

- Verificar a eficiência do processo de adesão *in vitro* para aço inoxidável e vidro, com *Pseudomonas* spp mesófila e psicrotrófica isoladas na primeira etapa (cap. 2).

- Comparar a eficiência de detergentes alcalino e ácido com detergente enzimático na redução logaritmica do processo de adesão.

- Verificar possível biotransferência da superfície de aço inoxidável aderida com *Pseudomonas* spp para substrato esterilizado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em três repetições, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microscopia eletrônica e Análise Ultra Estrutural do Departamento de Fitopatologia, ambos na Universidade Federal de Lavras.

2.1- Microrganismos selvagens

Foram isolados de tubulações de laticínio, após limpeza alcalina e ácida, descritos no capítulo 2.

2.1.1 Psicrófilo

O microrganismo selvagem com morfologia de bastonete, Gram-negativo, oxidase positiva, crescimento em meio MacConkey, O (oxidação) de O/F positiva e F (fermentação) de O/F negativa com crescimento a 7 °C e ótimo a 25 °C, apresentou resultado em Api 20E (Biomeriéux) como *Pseudomonas* spp.

2.1.2 Mesófilo

Bastonete Gram-negativo, oxidase positiva, crescimento em meio MacConkey, O de O/F positiva e F de O/F negativa, não apresentou crescimento a 7 °C, sendo a temperatura ótima a 35 °C. O resultado em Api 20E também indicou bactéria do gênero *Pseudomonas*.

2.2 Curva de crescimento

Para a purificação do microrganismo, foram feitas três repicagens sucessivas em TSA (Tryptic Soy Agar) inclinado e caldo BHI (Brain and Heart Infusion) e, novamente, a bateria bioquímica com o Api 20E para confirmação.

2.2.1 Cepa psicrotrófica

Uma colônia foi retirada do meio sólido e passada para BHI durante 18h a 25 °C, depois, 10 µL do caldo BHI foram transferidos para 200mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e incubado à temperatura de 25 °C. O crescimento foi monitorado por absorbância e plaqueamento em superfície, pela técnica de microgotas, em intervalos de 2 h durante 48 horas.

2.2.2 Cepa mesófila

Foi retirada uma colônia do meio sólido e passada para BHI durante 18h a 35 °C, depois, 10 µL do caldo BHI foram transferidos para 200mL de caldo TSB e incubado à temperatura de 35 °C. O crescimento foi monitorado por absorbância e plaqueamento em superfície, pela técnica de microgotas, em intervalos de 2 h durante 48 horas.

2.3 Preparação dos cupons de prova

Os cupons de aço inoxidável AISI 304 com dimensão de 10x15mm e 1mm de espessura, com um orifício em uma das extremidades, receberam o polimento 4, mais utilizado em equipamentos nas indústrias de alimentos.

Cada cupom foi unido a um anzol por linha de nylon e imerso em solução de hidróxido de sódio a 1% durante 30 minutos. Depois de enxágües consecutivos em água destilada foram passados no álcool 70% e novamente enxaguados e secos em estufa. Depois, foram autoclavados, em embalagens individuais, a 121 °C por 15 minutos (adaptado de Mello, 1997).

2.4 Modelo experimental para verificar a eficiência do processo de adesão de *Pseudomonas* spp cepa psicrotrófica e mesófila

Em dois Beckers de 2000mL, foi acoplada uma grade de aço inoxidável onde, com auxílio de pinça, foram pendurados pelo anzol quinze cupons em cada um (Figura 1a). Para agitação foi colocada no fundo agulha magnética (Figura 1b). O meio de cultura selecionado foi o leite em pó desnatado, reconstituído conforme orientação do fabricante e autoclavado a 121 °C por 10 minutos, enquanto todo material utilizado, vidraria, suportes, pinças, bailarinas foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos em autoclave.

Para verificação da aderência em vidro, nos Beckers do lado de fora, foram feitas três marcações (repetições) com caneta de marca permanente na dimensão de 2 x 5 cm perfazendo uma área de 10 cm² (Figura 1b). Após a montagem, 1800mL de leite desnatado foram adicionados ao Becker (Figuras 1c e 1d) e, para cepa psicrotrófica, 9mL de caldo TSB inoculados (com 13h de incubação) contendo a cultura de *Pseudomonas* spp em número de 10⁶ UFC/mL, conferidos por absorbância em comprimento de onda de 650nm e plaqueamento *pour plate* em TSA. O Becker foi vedado com parafilm e colocado sobre equipamento de agitação magnética, ambos dentro de estufa vertical regulada a 25 °C para a cepa psicrotrófica, onde permaneceram sob agitação por 18 horas. Para cepa mesófila foi repetido o mesmo procedimento, porém, a temperatura utilizada foi de 35 °C e o caldo TSI (inóculo com *Pseudomonas* spp) para contagem de 10⁶ UFC/mL foi obtido com 11 horas de incubação.

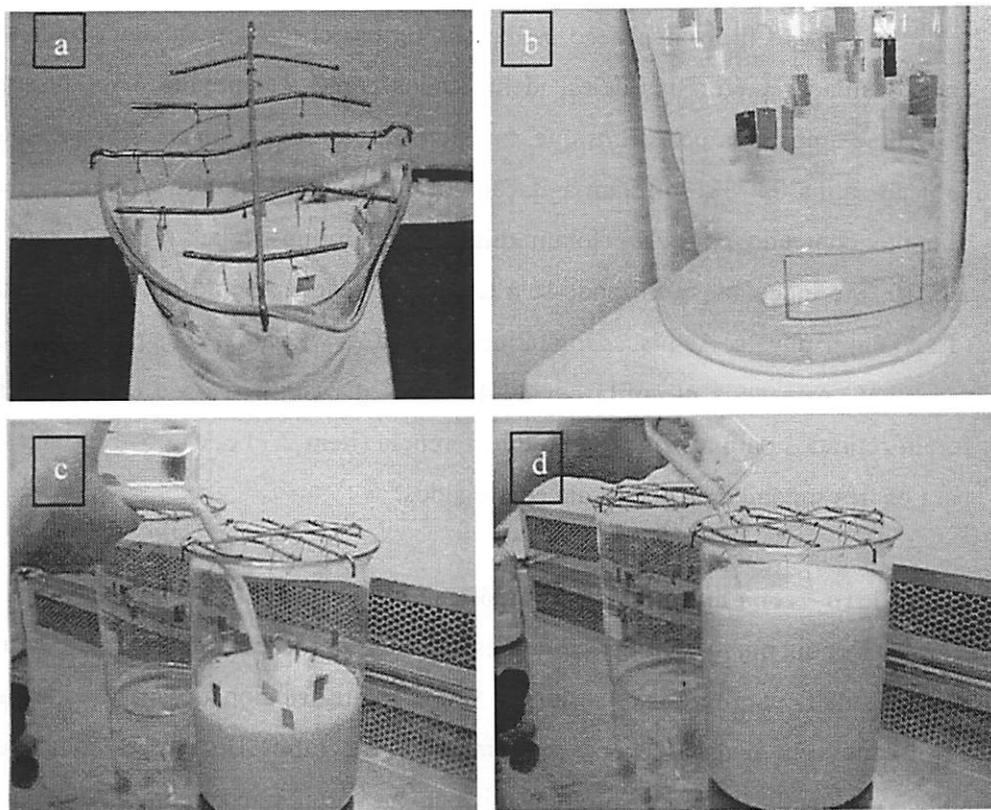


FIGURA 1: Modelo experimental para verificar a eficiência do processo de adesão de cepa psicrotrófica e mesófila de *Pseudomonas* spp em cupons de aço inoxidável (1a) e vidro (1b, demarcação). Substrato utilizado foi o leite desnatado (1c e 1d).

2.5 Determinação do número de células bacterianas aderidas

2.5.1 Aço inoxidável - cepa mesófila e psicrotrófica

Foi utilizada a técnica do esfregaço em superfície (Silva, Junqueira e Silveira, 2001), empregando *swabs* padronizados e esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

Após 18 h de incubação os cupons foram retirados e enxaguados com água destilada estéril; três deles, identificados como testemunha, tiveram sua superfície amostrada por *swabs* que, transferidos para tubos de ensaio contendo solução salina 0,85%, sofreram agitação em vórtex por 1 minuto. Alíquotas do diluente contendo os *swabs* foram diluídas, de forma seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), e inoculadas utilizando-se a técnica de plaqueamento *pour plate* com (TSA) em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C para a cepa psicrotrófica e a 35 °C para cepa mesófila por 24–48 horas. Dos outros doze cupons, três foram retirados para averiguar a biotransferência (item 2.7) e, os nove restantes, para os três tratamentos que foram empregados.

2.5.2 Vidro – cepa mesófila e psicrotrófica

Depois que os Beckers foram esvaziados, procedeu-se ao enxágüe com água destilada para retirar os resíduos. *Swabs* foram friccionados nas três áreas delimitadas em cada Becker e transferidos para tubos de ensaio contendo solução salina 0,85%, onde sofreram agitação em vórtex por 1 minuto. Alíquotas do diluente contendo os *swabs* foram diluídas, de forma seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e inoculadas, utilizando-se a técnica de plaqueamento *pour plate* com (TSA) em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C e a 35 °C para cepa psicrotrófica e mesófila respectivamente por 24–48 horas.

2.6 Teste de eficiência da detergência

Foram avaliados três tipos de limpeza: alcalina, alcalina e ácida, e enzimática, sendo os agentes utilizados: hidróxido de sódio, hidróxido de sódio e ácido nítrico e detergente enzimático Ultrasil 50 (Ecolab), respectivamente. Todos os detergentes foram padronizados a 1%.

2.6.1 Detergente alcalino

O hidróxido de sódio comercial foi preparado em concentração de 1%, apresentando pH médio de 13,2.

Foram submersos na solução alcalina seis cupons sob agitação constante, à temperatura de 68-70 °C, três deles foram retirados após 7 minutos, enxaguados em água destilada estéril e passados para solução ácida; os outros três permaneceram por mais 3 minutos, perfazendo 10 minutos de tempo de contato (Gândara,1995). Os cupons foram retirados da solução alcalina, enxaguados em água destilada estéril e tiveram um lado de sua superfície amostrada por *swabs* os quais foram colocados em solução salina 0,85% e submetidos a agitação em vórtex por 1 minuto. Aliquotas do diluente, contendo os *swabs* foram diluídas, de forma seriada e inoculadas utilizando-se a técnica de plaqueamento *pour plate* com (TSA) em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C e a 35 °C para microrganismo psicrotrófico e mesófilo, respectivamente, por 24-48 horas.

2.6.2 Detergente ácido

A solução de ácido nítrico a 1% apresentou pH médio de 0,92. Após o tratamento alcalino, três cupons foram submersos por 3 minutos na solução a 50 °C e, depois, enxaguados em água destilada estéril ; em seguida, tiveram 1 lado de sua superfície amostrada por *swabs* os quais foram colocados em solução salina 0,85% e submetidos à agitação em vórtex por 1 minuto. Aliquotas do diluente, contendo os *swabs* foram diluídas, de forma seriada e inoculadas utilizando-se a técnica de plaqueamento *pour plate* com (TSA) em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C e a 35 °C para microrganismo psicrotrófico e mesófilo, respectivamente, por 24-48 horas.

2.6.3 Detergente enzimático

O detergente Ultrasil 50 (Ecolab) é composto por enzimas proteolíticas, agentes complexantes orgânicos e inorgânicos e tensoativos aniônicos. Em concentração de 1% o pH médio é 7,2. Três cupons foram submersos por 10 minutos na solução a 40°C e, depois, foram enxaguados em água destilada estéril. Em seguida, tiveram um lado de sua superfície amostrada por *swabs* os quais foram colocados em solução salina 0,85% e submetidos à agitação em vórtex por 1 minuto. Alíquotas do diluente contendo os *swabs* foram diluídas, de forma seriada, e inoculadas utilizando-se a técnica de plaqueamento *pour plate* com (TSA) em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C e a 35 °C para microrganismo psicrotrófico e mesófilo, respectivamente, por 24-48 horas.

2.7 Biotransferência

Em Becker vazio e estéril, foram adicionados 1800mL de leite desnatado esterilizado a 121 °C por 10 minutos. Foi colocada sobre o Becker, grade estéril onde foram pendurados três cupons que ficaram inoculados por 18h a 25 °C (Item 2.5.1). Estes cupons foram previamente enxaguados e transferidos para o Becker que foi vedado com Parafilm, ficando sob agitação à temperatura de 25 °C. De 6 em 6 h, por 24 h, foi monitorada a possível biotransferência, pela retirada de alíquota de 1mL, a qual sofria diluições seriadas e eram plaqueadas pela técnica *pour plate* e incubadas a 25 °C para cepa psicrotrófica por 24/48 horas. Para a cepa mesofílica o procedimento foi o mesmo, alterando a temperatura de incubação para 35 °C.

2.8 Análise dos cupons por microscopia eletrônica de varredura

Para análise em MEV, foram colocados três cupons a mais em cada Becker (mesófilo e psicrotrófico) na última repetição do experimento. E um

cupom a mais em cada tratamento realizado, para que não sofresse ação do *swab*.

Os cupons com processo de adesão e, após os tratamentos, foram fixados em solução Karnovsky modificado, por uma semana, sob refrigeração; procedeu-se 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 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 estavam prontas para serem levadas ao microscópio eletrônico de varredura (Leo EVO 040) (Alves, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de crescimento

3.1.1 Ceba psicrotrófica

À temperatura de 25 °C em caldo TSB, o microrganismo isolado psicrotrófico, *Pseudomonas* spp, apresentou fase de adaptação de 5 h atingindo o final da fase exponencial em 45 horas. O tempo para a contagem de células atingir 10^6 UFC/mL, para inoculação no leite, deu-se com 13 h em absorbância 0,0833 (Figura 2).

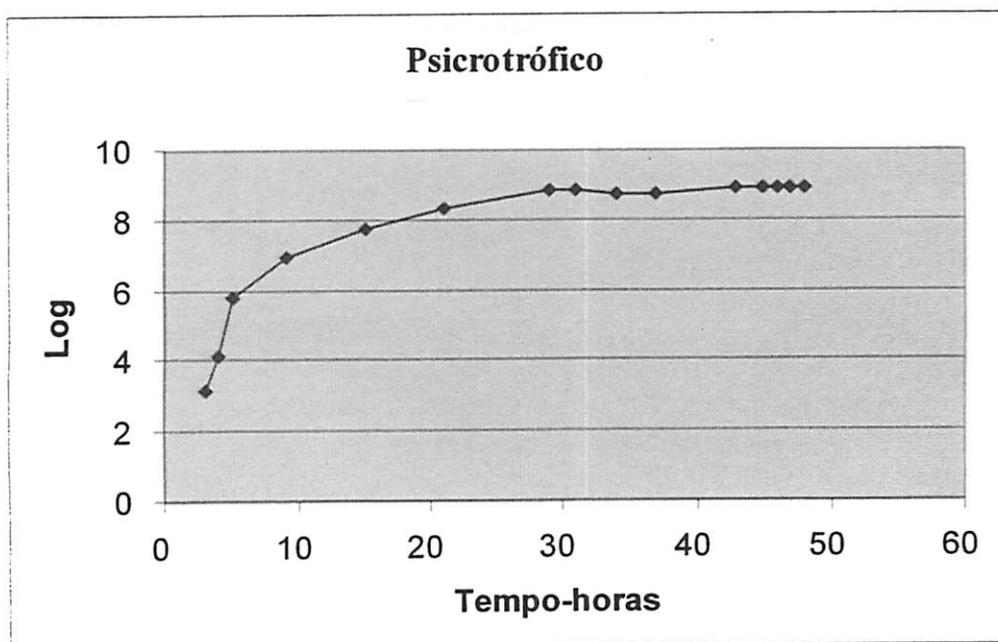


FIGURA 2: Curva de crescimento de cepa psicrotrófica, de *Pseudomonas* spp, isolada de tubulação de laticínio, monitorada de 2 em 2 h por 48 horas .

3.1.2 Cepa mesófila

O microrganismo mesófilo cultivado em caldo TSB a 35 °C apresentou fase lag de 4 h e atingiu o final da fase exponencial em 39 horas. O tempo para a contagem de células atingir 10^6 UFC/mL, para inoculação no leite, deu-se com 11h em absorvância 0,1168 (Figura 3).

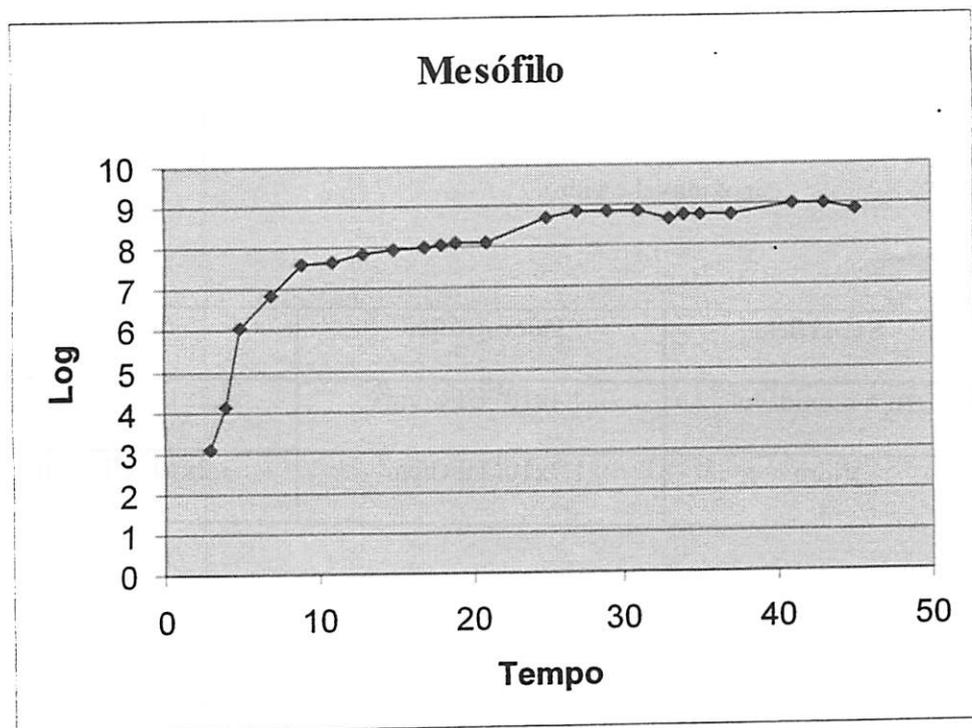


FIGURA 3: Curva de crescimento de *Pseudomonas* spp, cepa mesófila, isolada de tubulação de laticínios, monitorada de 2 em 2 h por 48 horas.

3.2 Avaliação da adesão de *Pseudomonas* spp psicrotrófica e mesófila em aço inoxidável e vidro.

3.2.1 *Pseudomonas* spp psicrotrófica

Observou-se processo de adesão para a cepa psicrotrófica em cupons de aço inoxidável, porém em superfície de vidro os valores foram menores que 10^5 (Quadro 1), caracterizando adesão não significativa..

QUADRO 1: Log do número em UFC/cm² de microrganismos mesófilos aeróbios e de psicrotróficos aderidos em superfícies de aço inoxidável e vidro.

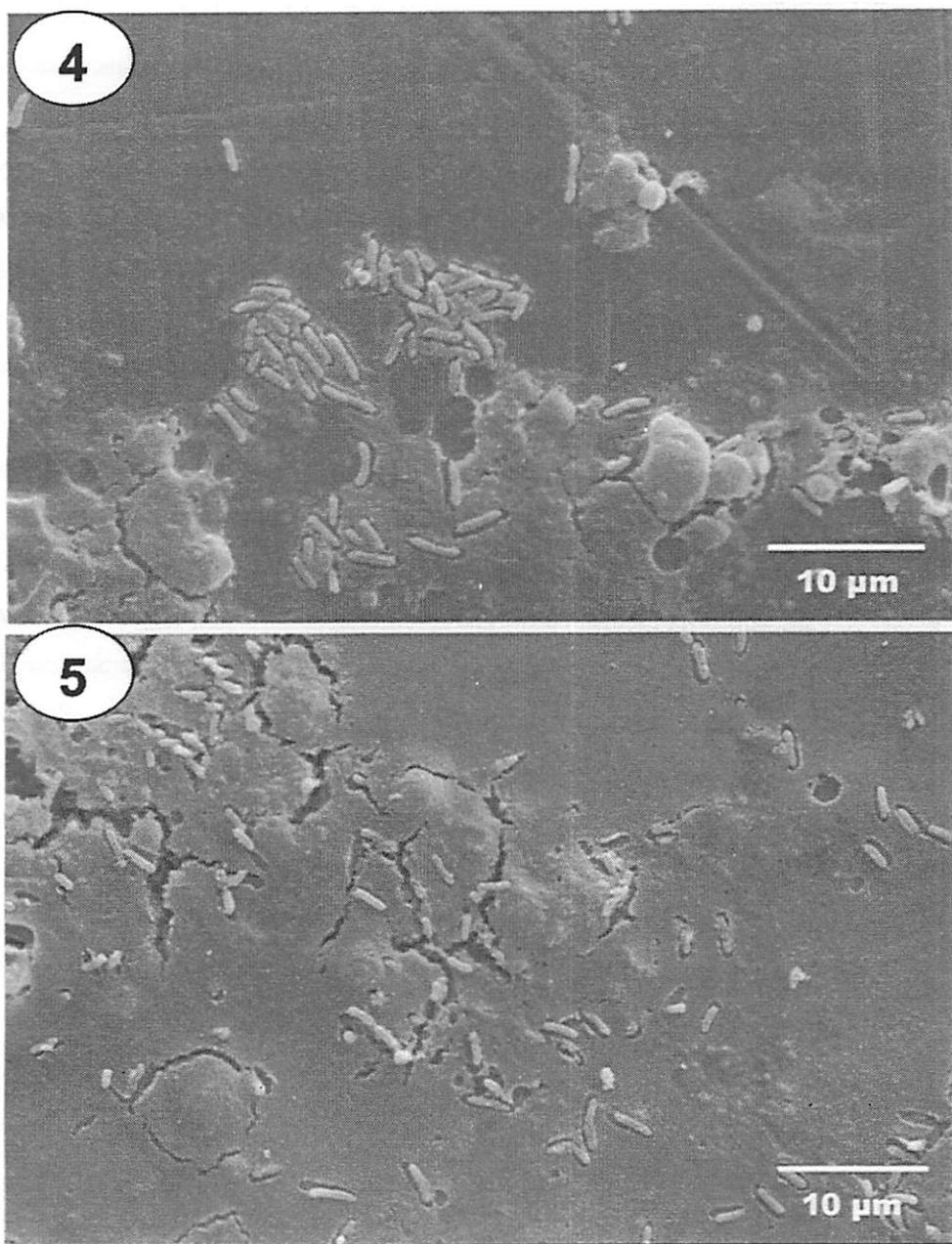
| Superfície | Psicrotrófico | Mesófilo |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Aço inoxidável | $4,4 \times 10^5$ UFC/cm ² | $4,3 \times 10^3$ UFC/cm ² |
| Vidro | $1,7 \times 10^4$ UFC/cm ² | $3,2 \times 10^2$ UFC/cm ² |

Parizzi (1998) em avaliação realizada por epifluorescência entre 10 e 12 h de contato para *L.innocua* e *S.aureus* encontrou valores variando de 10^5 e 10^6 UFC/cm² independente da superfície avaliada e ressalta que estes valores indicam um processo de adesão e não a formação de biofilme.

A cepa psicrotrófica (*Pseudomonas* spp) com 18 h de contato, obteve média de adesão em cupom de aço inoxidável de $4,4 \times 10^5$ UFC/cm², valores baixos se comparados aos de Costa (1996) que, utilizando carreadores de aço inox (AISI 304, nº4), mostrou que *P. fluorensceus*, com apenas 8 h de contato atingiu valores na ordem de 10^5 /cm² . Em vidro o valor de $1,7 \times 10^4$ UFC/cm² em 18 h,

pode, teoricamente, ser comparado com Jones & Bradshaw (1996) que avaliaram o desenvolvimento de biofilmes por três membros da família Enterobacteriaceae: *Klebsiella pneumoniae* cepa fixadora de nitrogênio, *Salmonella enteritides* e *Escherichia coli*, resultando contagem de 10^6 bactérias por cm^2 nas superfícies de tubos de vidro do reator, após 24 horas. Vários autores afirmam que o número de células aderidas se dá em função, principalmente, do tempo de contato e da carga microbiana inicial. Segundo Zottola & Sasahara (1994), cultura bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* adere em superfície de aço inoxidável em apenas 30 segundos, por isso, quanto maior o tempo de contato, maior a adesão. Resende (2005) encontrou adesão máxima entre 10^6 e 10^8 UFC/ cm^2 , o biofilme formado sob os cupons de prova pode ser explicado pelo tempo de exposição dos microrganismos à superfície de contato (240 horas).

A microscopia eletrônica de varredura (Figuras 4 e 5) permitiu visualizar a adesão de *Pseudomonas* spp psicrotrófica à matéria-orgânica na superfície dos cupons de aço inoxidável, sem formação de estruturas de adesão. Podendo ilustrar uma das teorias de formação de biofilme, segundo Characklis (1984), primeiro há adsorção de nutrientes e matéria orgânica e inorgânica para uma superfície sólida; depois, formação de uma camada com nutrientes orgânicos e inorgânicos, na seqüência a adesão dos microrganismos à superfície e multiplicação celular e, por fim, a intensa atividade metabólica do biofilme.

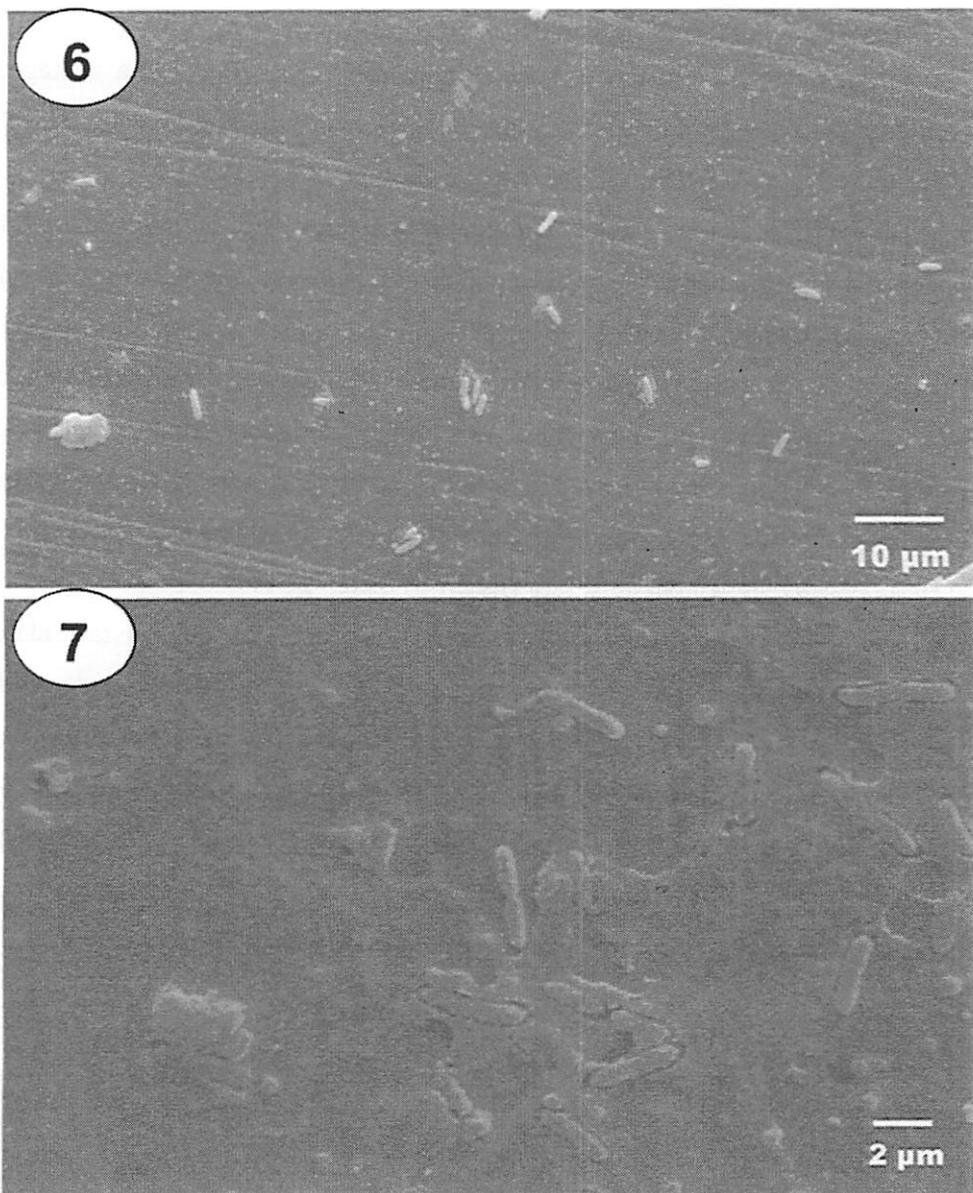


FIGURAS 4 e 5: Eletromicrografia de varredura de *Pseudomonas* spp, cepa psicrotrófica, aderida sobre matéria orgânica em superfície de aço inoxidável, sem presença de estruturas de adesão.

3.2.2 *Pseudomonas* spp mesófila

Os resultados não permitem afirmar adesão significativa, a contagem total em UFC/cm² foi de $4,6 \times 10^3$ para a superfície de aço inoxidável e de $3,2 \times 10^2$ para o vidro (Quadro 1). A baixa adesão pode ser explicada sob vários aspectos já que muitos fatores interferem neste processo: a morfologia do microrganismo (constituição de membrana, pili, fimbria, flagelo, carga elétrica superficial) interação com a superfície (carga elétrica e microtopografia), características do meio (pH, nutrientes do meio) e tempo de contato. Tudo indica que as características individuais dos microrganismos e as superfícies influenciaram no processo de adesão, uma vez que as condições de substrato e temperatura foram as mesmas. Nas figuras 6 e 7, pode-se observar a adesão de bactérias à superfície sem substrato (figura 6) e com pouco substrato (figura 7), ambas não apresentam formação de estruturas de adesão, os exopolissacarídeos. A figura 6 corrobora com outro tipo de teoria, em que primeiro há adesão da célula na superfície, depois a colonização e agregação de nutrientes (cap.1, p.14).

A hidrofobicidade e a carga elétrica das superfícies podem ter influenciado no processo de adesão. Essas forças físico-químicas têm sido consideradas importantes na adesão bacteriana, contudo, os mecanismos pelos quais atuam não têm sido completamente elucidados (Hood & Zottola, 1995).



FIGURAS 6 e 7: Eletromicrografia de varredura de *Pseudomonas* spp, cepa mesófila, aderida em superfície de aço inoxidável, sem presença de estruturas de adesão.

A análise estatística realizada (análise de variância) para verificar a interação entre cepas (mesófila e psicrotrófica) e superfícies (aço inoxidável e vidro) mostra que só há efeito de superfície. Como demonstra a figura 8, apesar das linhas não serem paralelas, a interação não é significativa. Outra análise indica que a superfície de vidro reduz a contagem em 1.05; isso demonstra que, as contagens são dez vezes menores, aproximadamente, para o vidro.

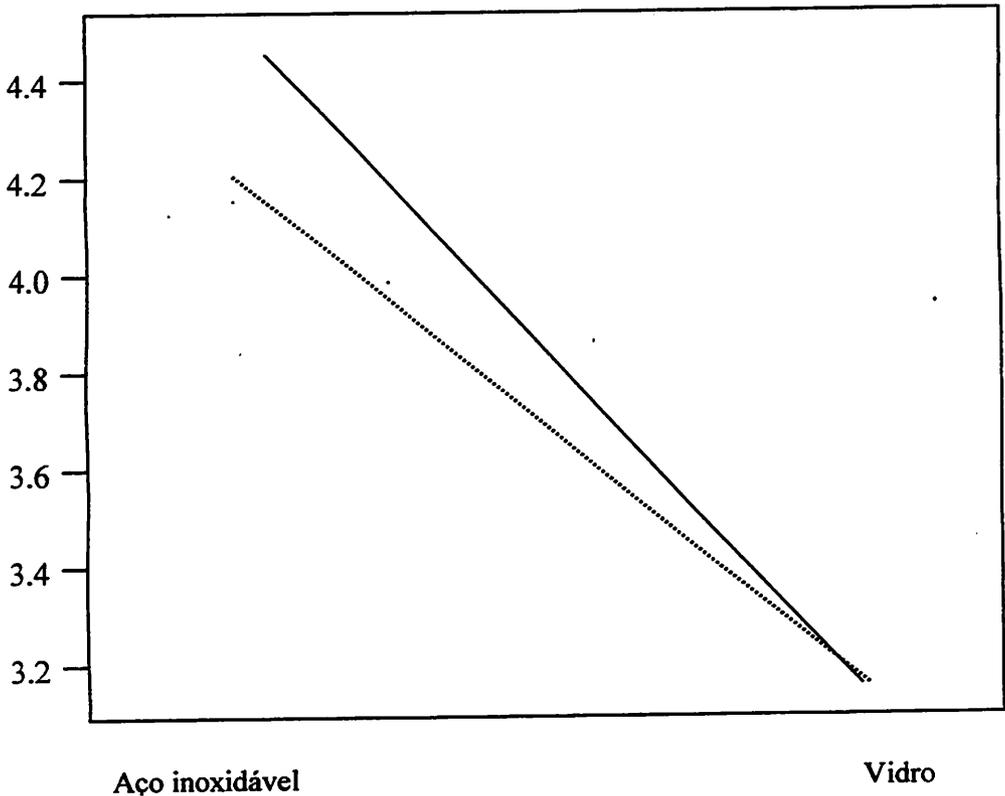


FIGURA 8: Log do número de células aderidas, mesófilas e psicrotróficas, em superfície de aço inoxidável e vidro. A linha contínua representa a cepa psicrotrófica e, a tracejada, a cepa mesófila.

Apesar de alguns estudos apresentarem adesão significativa de microrganismos em superfícies de vidro, segundo Bower, MacGuire e Daeschel (1996), materiais hidrofílicos como o vidro são conhecidos por desencorajar adesão bacteriana e são, portanto, freqüentemente utilizados para superfícies que entrem em contato com alimentos. Isto é devido, em parte, à baixa energia interfacial do sólido com a solução, característica destes materiais e ao fato da célula e superfície apresentarem carga similar.

Tanto para a cepa psicrotrófica quanto para a mesófila, há de se observar o método empregado para enumerar as bactérias por cm^2 ; na técnica do esfregaço em superfície, nem todas as células aderidas são removidas pelo *swab*. E, mesmo quando o *swab* é submetido ao vórtex, não é garantido que todas as células vão para a solução diluente, é o que ressalta Parizzi (1998) ao comparar a técnica de contagem padrão em placas com a epifluorescência.

A eletromicrografia de varredura expõe uma menor adesão de microrganismos à superfície de aço inoxidável, neste caso há dois tipos de iniciação de adesão, uma com depósito prévio de matéria orgânica e a outra somente com as células aderidas. Esta última pode representar o início da teoria de Zottola (1994) cuja adesão divide-se em três etapas: fixação da bactéria à superfície, consolidação da bactéria à superfície e crescimento da bactéria na superfície.

3.3 Eficiência da detergência sobre a adesão em aço inoxidável.

Na leitura dos resultados observou-se que não houve crescimento em nenhuma placa semeada em TSA relacionada aos tratamentos alcalino, alcalino e ácido e enzimático. Todos os tratamentos foram eficientes na remoção de células aderidas para as duas cepas, mesófila e psicrotrófica. A eletromicrografia (Figura 9) ilustra o cupom de aço inoxidável sem nenhuma adesão. Após detergência enzimática, a fissura que pode ser visualizada, não apresenta microrganismos

aderidos. Estes dados vão ao encontro daqueles coletados por Gândara (1995) que testou a eficiência de detergentes ácido e alcalino em cupons de aço inoxidável sobre adesão de *Streptococcus thermophilus* na ordem de 10^4 UFC/cm², ambos foram efetivos reduzindo a contagem a zero.

Quinze agentes de limpeza entre enzimáticos e não enzimáticos, usados diariamente para materiais médicos, foram testados com biofilmes induzidos por *Escherichia coli* 54127 em tubos de vidro para hemodiálise. Após os tratamentos, cristal violeta 0,05% foi usado para colorir o biofilme residual e a quantificação foi feita pela absorbância do cristal violeta a 585nm. Os detergentes enzimáticos foram mais eficientes que os não enzimáticos Loukili et al. (2004).

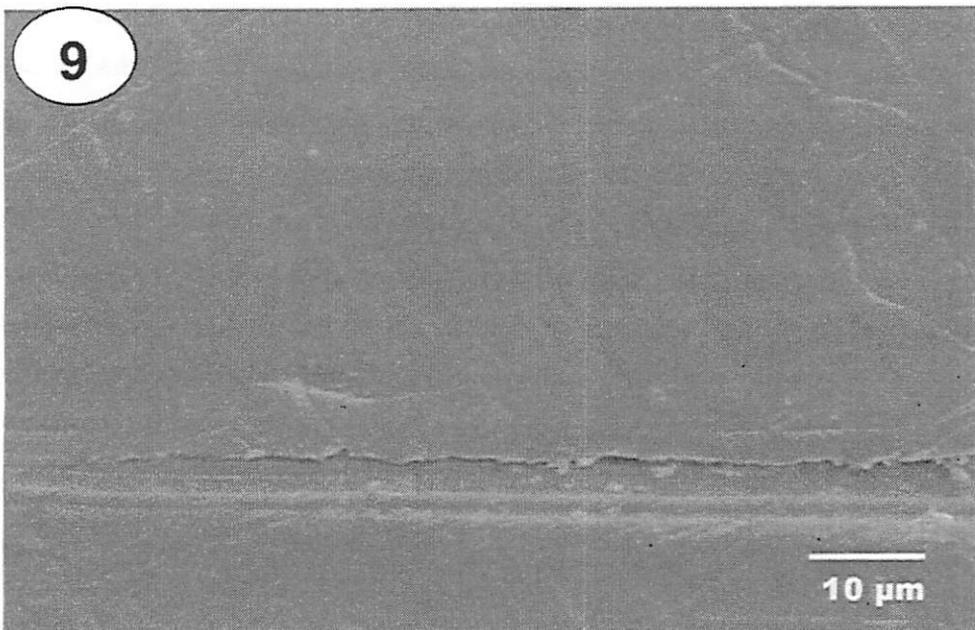


FIGURA 9: Eletromicrografia de varredura de cupom de aço inoxidável após limpeza com detergente enzimático.

3.4 Potencial de biotransferência

Houve transferência de *Pseudomonas* spp dos cupons aderidos para o meio circundante (leite estéril). Para a cepa psicrotrófica foram obtidas contagens crescentes ao longo de 24 h, de 10^5 (6h) até 10^9 (24h), sendo a média do valor final das três repetições $5,0 \times 10^8$ UFC/mL ao final de 24 horas. A cepa mesófila apresentou contagens de 10^4 (6h) até 10^8 (24h) e a média em 24 horas de $3,2 \times 10^7$ (Quadro 2). Os resultados levam a acreditar que o número inicial de microrganismos influencia no resultado, uma vez que a adesão para cepa psicrotrófica foi maior que para a mesófila. A dificuldade em comparar resultados é ocasionada pela escassez de dados na literatura e o termo biotransferência é usado como sinônimo de adesão para alguns autores.

QUADRO 2: Log do número de células mesófilas e psicrotróficas, encontrado no substrato durante monitoramento de 6 em 6 h por 24 horas.

| Cepa | Contagem inicial | Contagem final | Média final das três repetições |
|---------------|------------------|----------------|---------------------------------|
| Mesófila | 10^4 UFC/mL | 10^8 UFC/mL | $3,2 \times 10^7$ UFC/mL |
| Psicrotrófica | 10^5 UFC/mL | 10^9 UFC/mL | $5,0 \times 10^8$ UFC/mL |

4. CONCLUSÕES

A diferença de adesão entre as cepas mesófila e psicrotrófica de *Pseudomonas* spp, chega a dois ciclos log, para a superfície de aço inoxidável e vidro.

O vidro apresentou menor potencial de adesão que o aço inoxidável.

O detergente enzimático pode ser considerado uma alternativa a detergentes alcalinos e ácidos, uma vez que todos apresentaram o mesmo resultado na remoção de microrganismos.

Houve biotransferência importante dos cupons de aço inoxidável aderidos com células de *Pseudomonas* spp, tanto para o experimento de mesófilo como de psicrotrófico, atingindo contagens próximas de 10^8 e 10^9 , respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43 p.

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

CHARACKLIS, W. G. Biofilm development: A process analysis. In: MARSHALL, K. C. (Ed.). **Microbial Adhesion and Aggregation**. New York: Springer Verlag, 1984. 227 p.

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

GÂNDARA, A. L. N. **Características de crescimento de uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus*, sua adesão em superfície de aço inoxidável e comportamento frente a detergentes e sanificação**, 1995, 75p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

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

JONES, K.; BRADSHAW, S.B. Biofilm formation by the Enterobacteriaceae: A comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*, **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 80, p. 548-564, 1996.

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

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, June 1998.

LOUKILI, N. H.; ZINK, E.; GRANDADAM, S.; BIENTZ, M.; MEUNIER, O. Effectiveness of detergent–disinfecting agents on *Escherichia coli* 54127 biofilm. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 57, n. 2, p. 175-178, June 2004.

MAFU, A. A.; ROY, D.; COULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. **Food of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 9, p. 742-746, Sept. 1990.

MELLO, C. A. **Avaliação de sanificantes químicos em condições de uso simulado sobre psicrotróficos acidificantes**. 1997. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas**. 1998. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

RESENDE, J. G. O. S. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: livraria Varela, 2001. 318 p.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry ? **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, July 1994.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International Food Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 125-148, Oct. 1994.