

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DE UMA LINHAGEM SELVAGEM
DE *Streptococcus thermophilus*, SUA ADESÃO EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INÓXIDÁVEL E COMPORTAMENTO FRENTE À DETERGÊNCIA E
Parecer SANIFICAÇÃO.**

*Este exemplar corresponde a relação final
da tese defendida por Ana Lourdes Neves
Gândara e aprovada pela Comissão
Julgadora em* **Ana Lourdes Neves Gândara**
20.10.95.

Salvo de Mesquita

Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira
orientador

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.**

Campinas - São Paulo
1995

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	7/UNICAMP
	G151c
	Ex.
TOMBO BC/	26420
PROD	667/96
	0 [X]
	R\$ 13,00
	13/06/96
	CPD

CX-00082521-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

G151c

Gândara, Ana Lourdes Neves

Características de crescimento de uma linhagem selvagem de streptococcus thermophilus, sua adesão em superfície de aço inoxidável e comportamento frente à detergência e sanificação / Ana Lourdes Neves Gândara --Campinas, SP: [s.n.], 1995.

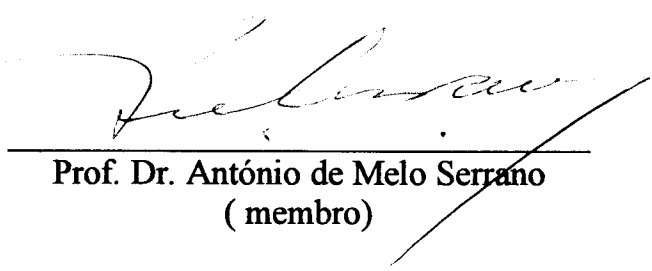
Orientador: José Sátiro de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Streptococcus thermophilus. 2. Adesão. 3. Limpeza. 4. Desinfecção. 5. Crescimento. I. Oliveira, José Sátiro de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

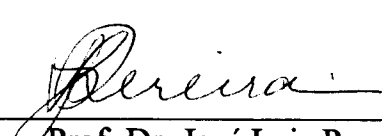
Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira
(orientador)



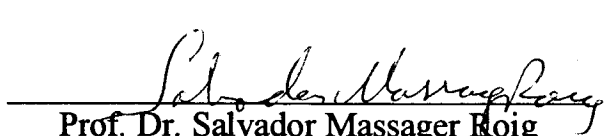
Prof. Dr. António de Melo Serrano
(membro)



Prof. Dr. Arnaldo Yoshitero Kuaye
(membro)



Prof. Dr. José Luis Pereira
(membro)



Prof. Dr. Salvador Massager Hoig
(membro)

Campinas, 20 de outubro de 1995

Ao meu Pai e ao Prof. Sátiro
que sem querer fizeram destes
momentos um período marcante
pelo Carinho, Compreensão e Estímulo...

... àquele que não acredita na Felicidade.

À Bela Vista Produtos Enzimáticos Ltda que nos forneceu a cultura referência.

À Diversey do Brasil que nos forneceu os detergentes necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

À Silvia e Ronaldo Busani pela contribuição, participação e colaboração.

À Maria Raquel Oriani e ao Marcelo Cristianini pelo auxílio e colaboração.

Às Prof^{as} Debora Tavares e Maria Aparecida Martins Rodrigues e a colega Yara Honório pela microscopia eletrônica.

Às colegas Maria Auxiliadora, Maria Elizabete, Cláudia, Ana Maria, Alice e Rosa Maria pela colaboração decisiva.

Aos colegas Armando Camargo e José Roberto por terem em muitos momentos facilitado a execução deste trabalho.

Aos colegas da Biblioteca da Faculdade pela paciência e compreensão.

Ao meu mestre Prof. Antônio de Melo Serrano pelo carinho e amizade.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos pelo amor, carinho e compreensão.

A todos,

Agradeço

ÍNDICE

RESUMO.....	x
SUMMARY	xi
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 - Microbiota do leite.	3
2.1.1 - Microbiota termodúrica.....	4
2.1.2 - Microrganismos termodúricos e a qualidade do leite	5
2.2 - <i>Streptococcus</i> termorresistente em sistema de pasteurização.....	6
2.3 - Sistema de limpeza em pasteurizador de leite	8
2.3.1 - Limpeza CIP em sistema de pasteurização.....	8
2.3.2 - Sanificação em sistema de pasteurização.....	9
2.3.3 - Etapas de limpeza em pasteurizador de leite.....	10
2.4 - Formação de biofilmes microbiano.....	10
2.4.1 - Estruturas das células de um biofilme.	11
2.4.2 - Características da matriz de adesão	12
2.4.3 - Parâmetros importantes na adesão.	14
2.4.4 - Estrutura flagelar no processo de adesão	15
2.5 - Efeito de substâncias químicas sobre biofilmes	16
2.5.1 - Limpeza CIP e microrganismos aderidos.....	19
2.6 - <i>Streptococcus thermophilus</i>	20
2.6.1 - Histórico	20
2.6.2 - Características do microrganismo.....	21
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 - Materiais	25
3.1.1 - Microrganismo selvagem	25
3.1.2 - Microrganismo de referência.....	25

3.1.3 - Meios de cultura e diluentes.....	25
3.1.4 - Equipamentos	26
3.2 - Métodos	26
3.2.1 - Caracterização do microrganismo	26
3.2.1.1 -Identificação do microrganismo selvagem.....	26
Hidrólise da uréia.....	27
Avaliação do pH e tempo de coagulação	27
Crescimento em "litmus milk".....	27
3.2.1.2 - Crescimento em meio sólido.....	27
3.2.1.3 - Curva de crescimento	28
3.2.1.4 - Tempo de geração.....	28
3.2.1.5 - Curva de acidificação	27
3.2.1.6 - Armazenamento a 10°C.....	29
3.2.1.7 - Curva de sobrevivência térmica	29
3.2.1.8 - Preparo do aço inoxidável para microscopia eletrônica	30
3.2.2 - Modelo experimental para avaliação da adesão do microrganismo.....	31
3.2.2.1 - Preparo do modelo experimental.....	31
3.2.2.2 - Método de contato para simulação adesão em placas de pasteurizador	32
3.2.2.3 - Método de detergentia e sanificação.....	32
3.2.2.4 - Amostragem para controle da carga de microrganismo.....	34
3.2.2.5 - Método de contagem do microrganismo.....	35
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 - Caracterização do microrganismo.....	38
4.1.1 - Identificação do microrganismo selvagem.....	38
4.1.2 - Crescimento em meios sólidos.....	40
4.1.3 - Curva de crescimento.....	43
4.1.4 - Tempo de geração.....	44
4.1.5 - Curvas de acidificação.....	44
4.1.6 - Armazenamento a 10°C.....	50

4.1.7 - Curva de sobrevivência a 72°C.....	50
4.1.8 - Formação de estruturas de adesão.....	52
4.2 - Efeitos da detergência e sanificação sobre biofilme aderido à superfície de aço inoxidável	53
5 - CONCLUSÕES.....	60
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
7 -ANEXO	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema do modelo experimental utilizado para a formação de biofilme do microrganismo em placas de aço inox.....	32
FIGURA 2.	Etapas da detergência e sanificação, temperatura e tempo de tratamento para os diferentes agentes utilizados	33
FIGURA 3.	Sequência de etapas utilizadas no experimento e pontos de - controle das contagens do microrganismo do leite, água de enxague e aquela aderida às placas de aço inox antes e após a detergência alcalina e ácida	36
FIGURA 4.	Sequência de etapas utilizadas no experimento e pontos de controle das contagens do microrganismo do leite, água de enxague e aquela aderida às placas de aço inox antes e após a detergência alcalina, ácida e a sanificação	37
FIGURA 5.	Curva de crescimento de <i>S. thermophilus</i> linhagem referência e selvagem em caldo M17 a 45°C	43
FIGURA 6.	Curvas de acidificação de <i>S. thermophilus</i> linhagem referência e selvagem em leite a 35, 40, 45 e 50°C.....	45
FIGURA 7..	Curvas de pH de <i>S. thermophilus</i> linhagem referência e selvagem em leite a 35, 40, 45 e 50°C.....	47
FIGURA 8.	Curva do número de <i>S. thermophilus</i> linhagem selvagem sobreviventes em leite a 72°C	51
FIGURA 9	Estruturas de adesão produzidas por <i>S. thermophilus</i> linhagem selvagem aderido em superfície de aço inox (10000x MEV)	52

FIGURA 10. Cargas de <i>S. thermophilus</i> linhagem selvagem aderidas em placas de aço inox antes e após a detergência alcalina e ácida.....	57
FIGURA 11. Cargas de <i>S. thermophilus</i> linhagem selvagem aderidas em placas de aço inox antes e após a detergência e sanificação.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Testes de identificação realizados para o microrganismo selvagem isolado de leite pasteurizado	39
TABELA 2. Número de <i>S. thermophilus</i> linhagem referência e selvagem em diferentes meios sólidos a 37°C/48 h e 45°C/24h.....	40
TABELA 3. Acidez e pH desenvolvida por <i>S. thermophilus</i> linhagem referência e selvagem em leite por 8 h a diferentes temperaturas	48
TABELA 4. Contagens de <i>S. thermophilus</i> linhagem referência e selvagem em 0, 2, 4 e 6 dias e porcentagens de sobreviventes em leite a 10°C.....	50
TABELA 5 - Número de <i>Streptococcus thermophilus</i> em leite a 45°C, em placas de aço inox antes e após a detergência alcalina (Liquibrite, solução 1%, pH12) e detergência ácida (Dilac U, solução 1%, pH 1,3) com suas águas de enxague.....	54
TABELA 6 - Número de <i>Streptococcus thermophilus</i> em leite a 45°C, em placas de aço inox antes e após a detergência alcalina (Liquibrite, solução 1%, pH12) e detergência ácida (Dilac U, solução 1%, pH 1,3) e sanificação com hipoclorito de sódio a 100 ppm com suas águas de enxague.....	55

RESUMO

Microrganismo selvagem isolado de leite pasteurizado, obtido de processo contínuo de pasteurização HTST com 4 h de operação foi identificado como *Streptococcus thermophilus*, formando a maior densidade celular em caldo M17 a 45°C em 6h. O número de células viáveis desse microrganismo foi avaliado em meios de cultura PCA, APT, MRS e M17 sendo os meios M17 e MRS os que permitiram melhor crescimento. Menores contagens do microrganismo foram observadas no meio APT em relação aos meios anteriores, não ocorrendo crescimento em meio PCA.

Em leite foram avaliados o tempo de geração, destruição térmica a 72°C, armazenamento da cultura a 10°C e formação de estruturas de adesão. O microrganismo apresentou um tempo de geração de 15,2 minutos a 45°C e um valor D_{72} de 7,4 minutos. Na temperatura de 10°C, armazenado por 6 dias, 57,1% das células desse *Streptococcus* permanecem viáveis; esse microrganismo também forma em 20 h estruturas de adesão em superfícies de aço inoxidável, observada através de microscopia eletrônica de varredura. A produção de ácido láctico em leite foi avaliada a 35, 40, 45 e 50°C por 8 h, os maiores teores foram obtidos a 45°C (0,35%) e 40°C (0,34%), menores teores ocorreram respectivamente a 50 e 35°C.

Em leite a adesão desse *S. thermophilus* em superfícies de aço inoxidável foi estudada em 6 h de contato a 45°C sob agitação e uma higienização com etapas de limpeza com detergentes alcalino e ácido, seguidas de sanificação foi utilizada para avaliação do comportamento das células aderidas frente à higienização. Esse microrganismo aderiu às superfícies de aço inoxidável produzindo uma carga de 10^4 células/cm². Após a limpeza alcalina não foram detectadas células aderidas, porém, em seguida a limpeza ácida, 6 células/cm² ainda foram detectadas nessa superfície. A sanificação com hipoclorito de sódio a 100 ppm após a limpeza foi suficiente para reduzir a níveis não detectáveis a carga de *S. thermophilus* selvagem aderidas às superfícies de aço inoxidável.

SUMMARY

A wild microorganism, isolated from HTST pasteurized milk processed in a continuous 4 hour operation, was identified as *Streptococcus thermophilus*, giving greater cellular growth in M17 broth, incubated for 6 hours at 45°C. The viable cell count was evaluated in PCA, APT, MRS e M17, the media M17 and MRS being shown to allow for better growth. Microorganism lower count was observed in APT in relation to M17 and MRS and no growth occurred in PCA medium.

The generation time, thermal destruction at 72°C, storage of the culture at 10°C and formation of adhesive structures were evaluated in milk. The organism showed a generation time of 15.2 minutes at 45°C and a D_{72} value of 7.4 minutes. After storage at 10°C for 6 days, 57.1% of *Streptococcus* cells remained viable, and organism formed adhesive structures on stainless steel surfaces in 20 hours, these being observed using a scanning electronic microscope. The production of lactic acid was determined after 8 hours incubation at 35, 40, 45 and 50°C, greatest values being obtained at 45°C (0.35%) and at 40°C (0.34%), lower values being obtained at 50 and 35°C respectively.

The adhesion of this *S. thermophilus* onto stainless steel surfaces was studied after 6 hours of contact at 45°C with agitation. A cleansing process involving cleaning stages with alkaline and acid detergents followed by sanification was used to evaluate the resistance of the adhered cells. The microorganism adhered to stainless steel surfaces producing a cell load of 10^4 cells/cm². After alkaline cleansing, no adhered cells were detected but after acid cleansing, 6 cells/cm² were still detected on surface. Cleansing followed by sanification with 100 ppm sodium hypochlorite was sufficient to reduce the load of wild *S. thermophilus* on the stainless steel surface to non detectable levels.

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus thermophilus tem sido apontado como causador de problemas tecnológicos em indústrias de pasteurização de leite por processo contínuo, quando o tempo de operação varia de 6 a 12 h ininterruptas. 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 do leite pasteurizado obtido nas últimas horas de processo, podendo atingir 10^4 a 10^6 células/ml após um tempo de pasteurização de até 12 h.

Leite obtido no final de processos de pasteurização, com elevado número de termodúricos provocado pelo aumento de *Streptococcus thermophilus*, pode determinar inadequação do produto frente aos padrões da legislação e, na fabricação de queijos, provocar defeitos de sabor e excessivas olhaduras, principalmente em queijos de massa fechada.

O presente trabalho teve como objetivos a identificação taxonômica de um microrganismo do grupo dos cocos, Gram positivo, termodúrico, isolado de leite pasteurizado, identificado como causador do aumento nas contagens de células viáveis durante pasteurização contínua de leite em estabelecimento comercial.

Esse microrganismo selvagem foi obtido a partir de amostras de leite pasteurizado através de tratamento térmico "High Temperature, Short Time (H.T.S.T.)", com temperatura de pasteurização na faixa de 72-75°C por 15 segundos, em uma usina de beneficiamento de leite. O processamento era realizado por um período de 6 horas por dia, ao final do qual se procedia a limpeza. Utilizava-se limpeza tipo "Cleaning in Place (C.I.P.)" com detergente alcalino e ácido, ambos na concentração de 1 %, seguida de sanificação com hipoclorito de sódio a 100 ppm.

Na pasteurização notava-se que durante o processo de tratamento térmico do leite ocorria variação das contagens totais de microrganismos de 10^2 ufc/ml na primeira hora até valores de 10^4 ufc/ml nas últimas horas de processo (cerca de 5 a 6 h). Esse leite,

com variação nas contagens de microrganismos, era amostrado na 4ª h do processo para contagem total de microrganismos em "Plate Count Agar". As placas de contagem total dessas amostras de leite apresentavam colônias de 0,5mm, com morfologia semelhante, parecendo indicar microbiota única. As colônias isoladas eram catadas e inoculadas em leite desnatado reconstituído, estéril e incubadas a 35°C o que coagulava o leite em 24 h. As características morfológicas dos microrganismos isolados eram de cocos, Gram positivos, isolados ou aos pares e em cadeias de 4 a 6 unidades celulares.

Considerando que esse microrganismo, catalase negativa, apresentava o melhor tempo de crescimento no "litmus milk" em 8 h à temperatura de 45°C e a acidificação, coagulação e redução indicavam um microrganismo com características de bactéria láctica termófila, o meio M17 foi utilizado para reisolamento e purificação da cultura para os estudos subseqüentes.

No presente trabalho além da identificação e crescimento em diferentes meios de cultura foram também estudadas as suas características de crescimento em leite, comportamento frente ao tratamento térmico e armazenamento sob refrigeração, assim como sua capacidade de adesão em superfície de aço inoxidável e sua resistência à limpeza e sanificação nessa superfície.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - MICROBIOTA DO LEITE

O leite um alimento completo do ponto de vista nutricional, rico em proteínas, carboidratos, lipídios e sais minerais constitui-se num excelente substrato para manutenção e proliferação de microrganismos, possuindo, portanto, uma microbiota complexa e diversa, proveniente de várias fontes (OLIVEIRA, 1986). A composição dessa microbiota é influenciada por microrganismos presentes no úbere, na superfície externa dos animais, no meio ambiente e na sua alimentação, além daquela associada aos equipamentos, utensílios e contaminantes do ar (MATTILA et al, 1990).

Segundo FOSTER et al (1957) e ROBINSON (1987) diferentes bactérias tem sido isoladas de leite e as mais comumente encontradas pertencem aos gêneros: *Pseudomonas*, *Brucella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Mycobacterium*, além de microrganismos como *Campylobacter*, *Actinomyces bovis*, *Nocardia rubropertineta*, *Coxiella burnetti* e diversos tipos de bolores e leveduras.

Esses diferentes grupos de microrganismos eventualmente presentes no leite, em sua maioria estão relacionados com a limpeza e manuseio dos utensílios e equipamentos; cuidados durante a ordenha; higienização adequada dos animais, ordenhador e instalações; condições de saúde dos animais e temperatura de manutenção do leite (BURTON, 1986). Grupos específicos de microrganismos como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e coliformes normalmente são incluídos ao leite através de procedimentos inadequados de higienização (MATTILA et al, 1990).

Em leite cru, a carga bacteriana mais representativa possui baixa resistência térmica, sendo, portanto, eliminada durante o processo de pasteurização. A carga bacteriana do leite pasteurizado depende essencialmente do número de bactérias termodúricas presentes inicialmente no leite cru, além daquelas provenientes de contaminantes de limpeza e sanificação inadequadas das superfícies de contato, sendo que o número e variedade dos microrganismos envolvidos dependem da temperatura de manutenção utilizada na manipulação e estocagem desse leite (NIEMIERSKI et al, 1982; BURTON, 1986).

Estudos realizados por MAHARI & GASHE (1990) indicaram níveis de 98,1% de microrganismos psicotróficos, 1,4% de termodúricos e 0,5 % de termófilos em leite cru fresco. Os valores desses grupos de microrganismos para leite pasteurizado foram respectivamente da ordem de 53%, 39,5% e 7,5 %. Dentro desses grupos, microrganismos com morfologia de cocos aparecem em 71,6% dos isolados de leite cru, 56,5% em leite pasteurizado e 65% em leite pasteurizado em laboratório, sendo que os *Streptococcus* contribuem com mais de 45% dos cocos nos diferentes tratamentos.

2.1.1 - Microbiota termodúrica

Os microrganismos termodúricos presentes no leite, que suportam o tratamento da pasteurização, pertencem geralmente aos gêneros *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, bactérias corineformes além das bactérias esporogênicas como *Bacillus* e *Clostridium* (SPECK, 1984; RICHARDSON, 1985). Normalmente esses microrganismos são introduzidos no leite por procedimentos inadequados na limpeza e manuseio do leite durante a sua obtenção e tratamento (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

Dos microrganismos encontrados no leite, algumas espécies de *Streptococcus* e os *Lactobacillus*, são organismos desejáveis, sendo que as espécies termodúricas desses gêneros suportam 60°C por 20 minutos. Entretanto somente uma pequena porcentagem dos microrganismos termodúricos envolvidos nesses gêneros, aproximadamente 1%, pode sobreviver ao tratamento térmico de 63°C / 30 min. (ROBINSON, 1987).

Estudos realizados por MACHADO (1975) indicaram que os gêneros *Streptococcus* e *Micrococcus* predominam tanto na microbiota do leite cru quanto do leite pasteurizado, estando o gênero *Streptococcus* presente em 100% das amostras estudadas desses leites. Para BRUM (1977) as espécies termodúricas do gênero *Streptococcus* ocorrem em taxas reduzidas, não superior a 10 organismos por mililitro de leite cru. Já estudos realizados por MAXCY (1987), em amostras de leite pasteurizado, indicaram que 4,9% dos microrganismos isolados pertencem ao gênero *Streptococcus*.

As espécies termodúricas do gênero *Streptococcus* incluem principalmente *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecalis* e suas variedades e o *Streptococcus faecium* (ROBINSON, 1987).

2.1.2 - Microrganismos termodúricos e a qualidade do leite

Microrganismos termorresistentes podem influenciar diretamente a qualidade do leite quando estes aparecem em números elevados, sendo portanto o controle de microrganismos termodúricos em leite cru um recurso que pode ser utilizado para controlar a qualidade do leite pasteurizado (MOTTAR & WAES, 1986). A capacidade de resistência térmica dos microrganismos não depende somente de suas propriedades mas também é influenciada por fatores como: número inicial de células, tipo de alimento e método de tratamento térmico utilizado, sendo a sobrevivência de alguns desses microrganismos após o tratamento térmico, muitas vezes resultante de elevados números iniciais de microrganismos no leite (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

A vida de prateleira de um leite pasteurizado pode se estender por 3 semanas, estocado a 6°C ou menos, somente se a contagem de bactérias termodúricas no leite cru for menor que 10000 ufc/ml (unidade formadora de colônia por mililitro) (AUCLAIR, 1986). Essa carga de microrganismos termodúricos em leite, em geral é pouco controlada conforme indicado em levantamento realizado por STAAL (1986) sobre a legislação desse parâmetro de controle em países como Austrália, Bélgica, Canadá, Dinamarca, França, Alemanha, Índia, Itália, Suíça e USA para leite pasteurizado, apontando a Dinamarca como o único país que estabelece padrões de

controle para microrganismos termodúricos em leite pasteurizado, limitando a carga desse grupo de microrganismo em até 1000 ufc/ml.

THOMAS et al (1967) levantou as contagens de termodúricos em leite a partir de trabalhos publicados no período de 1945 a 1966, indicando que as bactérias termodúricas podem ser utilizadas como indicadoras de limpeza insatisfatória em unidades de beneficiamento e processamento de leite já que níveis maiores que 3×10^4 ufc/ml foram relacionados a essas condições. Para o autor valores menores que 10^4 ufc/ml desse grupo de microrganismos são aceitos para pagamento de leite por qualidade, como ocorre em algumas regiões da Itália.

Segundo VAN DEN BERG (1986) o controle do número de termodúricos deve ser adotado, em estabelecimentos de pasteurização de leite, quando trocadores de calor são utilizados em períodos prolongados de operação, em geral acima de 6 h, com a finalidade de controlar o número dessas bactérias durante o processo.

2.2 - *Streptococcus* TERMORRESISTENTE EM SISTEMA DE PASTEURIZAÇÃO.

Embora novas tecnologias tenham melhorado os processos de obtenção e tratamento do leite e a fabricação de queijos, problemas incomuns têm ocorrido como o crescimento de bactérias em sistemas para pasteurização de leite, tipo "Heat Temperature Short Time (H.T.S.T.)" (OLSON, 1983).

Considerando que a pasteurização não é um processo que elimina todos os microrganismos do leite, períodos extensos de pasteurização contínua podem provocar um aumento do número de bactérias termodúricas no leite pasteurizado obtido na fase final do processo de pasteurização (DRIESSEN et al, 1984; BOUMAN et al, 1982). Assim sendo o tempo de operação de um pasteurizador em usinas de beneficiamento de leite e queijarias é limitado pelo crescimento de *Streptococcus* nesses trocadores de calor (HUP et al, 1979). Esse gênero de microrganismo, segundo

THOMAS et al (1967), ocorre em leite obtido em fazendas de beneficiamento, na proporção de 1,1% na microbiota termodúrica.

BOUMAN et al (1982) estudaram o comportamento de *Streptococcus thermophilus* em sistemas de pasteurização de leite e demonstraram que essa bactéria adere nas placas do pasteurizador na seção de regeneração, principalmente do lado do leite pasteurizado, podendo produzir concentrações de 10^6 células/ml após um período contínuo de 8 h de pasteurização. A adesão de *Streptococcus thermophilus* após um tempo de operação de 12 h foi de 10^4 células/cm² nas placas da seção de regeneração com temperaturas variando de 30 a 40°C do lado do leite cru, enquanto no lado do leite pasteurizado, nas placas com temperatura entre 25 e 40°C, as contagens foram de 10^6 células/cm². Estes resultados foram confirmados por DRIESSEN et al (1984) que obteve, em sistema piloto de pasteurização de leite, uma adesão de *Streptococcus thermophilus* nas placas do pasteurizador de 10^7 células/cm² resultando em contagens de células viáveis no leite de 10^6 células/ml. O número de bactérias aderidas, segundo esses autores, depende da concentração destas no leite, estando a menor adesão no lado do leite cru relacionada a compostos inibidores termolábeis presentes nesse leite e constantemente renovados no sistema. Com a eliminação desses compostos pela pasteurização, as bactérias crescem rapidamente, facilitando a colonização das placas e conseqüentemente a formação de biofilme. Problemas similares, segundo VAN DEN BERG (1986), podem ocorrer em pontos mortos, uma vez que esse sistema em geral envolve estruturas complexas incluindo tubos, válvulas e vários equipamentos em linha.

As células planctônicas de biofilmes, formados nessas condições, podem ser arrastadas pelo fluxo contínuo de leite e dessa forma provocar altas contagens de microrganismos no leite pasteurizado, contagens que podem ser inaceitáveis, após longos períodos de pasteurização, por contrariar a legislação quanto ao padrão microbiológico. Por outro lado, as características termófilas das bactérias não influenciam adversamente a manutenção da qualidade do leite refrigerado (LEITÃO et al, 1987; BURTON, 1986), porém esse leite, quando utilizado na produção de queijos, pode causar defeitos no sabor, e em certas condições provocar excessivas olhaduras, além de sabor residual sujo e fermentado (HUP & STADHOUDERS, 1979).

HUP & STADHOUDERS (1979) estudando a excessiva formação de olhaduras em queijos tipo Gouda, obtido a partir de leite com altas contagens de

estreptococos termorresistentes, identificado como *Streptococcus thermophilus*, e fermento tipo BD (composto por *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. lactis subsp. diacetylactis* e *Leuconostoc*) concluiu que a intensidade do defeito pode ser influenciada pela formação de gás produzido pelas bactérias do próprio fermento a partir do ácido cítrico, somada ao gás produzido pelo *Streptococcus* termorresistente a partir da uréia do leite. A intensidade do defeito nesses casos pode ser controlada pela atividade e quantidade dos estreptococos que compoem o fermento, frente às linhagens selvagens de *Streptococcus thermophilus*.

2.3 - SISTEMA DE LIMPEZA EM PASTEURIZADOR DE LEITE

Sistemas fechados para pasteurização HTST de leite, normalmente incluem equipamentos com estruturas complexas com diferentes componentes tais como tubulações, válvulas, vedações entre outros, além de equipamentos como homogenizadores, bombas e trocadores de calor, os quais necessitam de tecnologia adequada para o procedimento de higienização do sistema (HAYES, 1985).

Essa complexa estrutura, utilizada nos sistemas de pasteurização, geralmente provoca, durante o processo, a formação de acúmulos de matéria orgânica em diferentes pontos, em maior ou menor intensidade. O nível de problema depende do desenho do equipamento, da operação adequada e do tipo de produto envolvido. Os procedimentos de limpeza e sanificação utilizados para a remoção de resíduos e contaminantes desses sistemas de equipamentos são em geral automatizados, sendo o sistema Cleanning in Place o mais empregado. As etapas para esses procedimentos de limpeza são geralmente estabelecidas em função do tipo de produto e porte do equipamento envolvido (MARRIOTT, 1989; GUTHRIE, 1988).

2.3.1 - Limpeza CIP em sistemas de pasteurização

Normalmente a limpeza CIP em sistemas com trocadores de calor para pasteurização de alimentos envolve várias etapas: 1- pré-enxague com água para a remoção de resíduos de alimentos; 2-circulação de detergente alcalino e detergente

ácido para remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos, os quais, em suspensão são eliminados através de enxagues subsequentes (HAYES, 1985; ICMSF, 1980). 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 sequência de etapas que envolvem esse procedimento (DAMEROW, 1993).

A limpeza CIP em sistemas fechados não é por si só suficiente e efetiva, sendo necessária uma limpeza manual periódica para evitar acúmulos de sujidades em pontos críticos ou mesmo a formação de biofilmes microbianos. Assim, é importante que esses equipamentos estejam envolvidos em um programa de limpeza, de modo a obter e manter o nível de limpeza necessário para produzir um alimento de boa qualidade. A avaliação das condições bacteriológicas dos componentes específicos do sistema de equipamento de pasteurização pode ser feita através de amostragens regulares da água de enxague antes e após a higienização do equipamento (MOTTAR & WAES, 1986).

A função dos detergentes num procedimento de limpeza é principalmente eliminar a matéria orgânica protéica e gordurosa, e mesmo as inorgânica como minerais que estejam aderidas às superfícies. Diferentes tipos de detergentes podem ser utilizados como os sais alcalinos e os álcalis, ácidos, tensoativos, polifosfatos, detergentes-sanificantes entre outros. A composição desses detergentes varia muito, consequentemente 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; HOBBS & GILBERT, 1986).

2.3.2 - Sanificação em sistemas de pasteurização

A sanificação em indústrias de alimentos pode ser obtida através do calor ou por agentes químicos. Os compostos químicos, os mais utilizados nesses procedimentos, são geralmente classificados de acordo com a sua composição, sendo os mais comuns os compostos a base de halogênios, quaternário de amônio, sanificantes ácidos e glutaraldeído. Cada grupo de sanificante difere na sua forma de

ação sobre os microrganismos e reage de forma diferente segundo o tipo e idade dos organismos envolvidos, influenciado por parâmetros como composição do solvente, pH e presença de eletrólitos principalmente (GUTHIER, 1988; ROBINSON, 1987).

Os sanificantes normalmente são utilizados imediatamente após o procedimento de limpeza para reduzir o número de microrganismos patogênicos e deterioradores dos alimentos processados e facilitar a preparação do alimento e do equipamento (MARRIOTT, 1989).

O agente sanificante mais utilizado em indústrias lácteas é o cloro, um halogênio que tem seu mecanismo de ação através do ácido hipocloroso, atuando a nível das proteínas da membrana celular, podendo também essa ação estar associada a inibição de certas reações enzimáticas vitais para os microrganismos. A eficácia do agente sanificante é afetada pelo pH da solução e outros fatores como concentração, temperatura, tempo, dureza da água, presença de matéria orgânica, amoníaco ou compostos de amônio quaternário (ROBINSON, 1987).

2.3.3 - Etapas da limpeza em pasteurizadores de leite

No procedimento de limpeza CIP para pasteurizadores de leite, um detergente alcalino e um detergente a base de ácido orgânico são os agentes de limpeza mais utilizados e recomendados pelos órgãos de inspeção. A concentração do detergente varia na faixa de 0,5 a 1,0% e deve ser utilizado à temperatura de 77-80°C com circulação por 30 a 40 minutos. A sanificação, etapa posterior a limpeza, utilizando hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo a 100 ppm é recomendada por um tempo de 15 a 20 minutos a temperaturas não superiores a 20°C. Essa sanificação é indicada, normalmente antes do uso do equipamento para processamento de um alimento, com a finalidade de eliminar possíveis contaminantes remanescentes no sistema (BRASIL, 1978).

Quanto ao aspecto prático o procedimento para limpeza CIP é em geral recomendado pelo fabricante do equipamento. A orientação de limpeza para sistemas que incluem trocadores de calor, utilizados para pasteurização de leite, envolvem: pré-enxague com água morna por 8 minutos; circulação com detergente alcalino por 20 minutos a uma temperatura de 75°C; enxague intermediário com água; circulação de

detergente ácido por 15 minutos a 70°C e um enxague final com água fria por 8 minutos. A desinfecção deve ser efetuada antes de um novo processamento e pode ser através de um enxague com água quente por 5 minutos; circulação com água a 90°C por mais que 8 minutos seguido de resfriamento até a temperatura a ser utilizada no processo (ALFA- LAVAL).

2.4 - FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO

As bactérias possuem a tendência a aderir às superfícies formando pela adesão os biofilmes microbianos (COSTERTON, 1990). Para MARSHALL et al (1971) a adesão ocorre em duas fases: a primeira relacionada às forças de atração de "Van der Waal" e eletrostática, considerada reversível onde as bactérias aderidas fracamente à superfície apresentam movimento browniano, e a segunda, dependente de tempo, envolvendo a formação de polímeros, os quais formam pontes de adesão com a superfície; nessa fase os microrganismos envolvidos não mais apresentam movimento browniano e são mais difíceis de serem removidos.

Essa adesão de bactérias ocorre por meio de um aglomerado de fibrilas ou fibras emaranhadas de polissacarídeos que se estende da bactéria até a superfície, formando uma matriz de substâncias que circunda as células ou colônias (COSTERTON, 1978 citado por: EDEN, 1981; ZOTTOLA, 1990). Essa matriz fixa a bactéria na superfície, canaliza vários nutrientes junto a esses organismos, concentra e conserva enzimas digestivas liberadas, resultando em crescimento e formação de colônias que se unem para formar os biofilmes pelo aumento do tamanho e número dessas microcolônias aderidas (ANWAR et al, 1992). Esse microecossistema, formado pela adesão, exerce um profundo efeito sobre as bactérias envolvidas nesse processo, que alteram seus processos fisiológicos, suas estruturas superficiais e sua afinidade com o meio fluido (COSTERTON, 1990).

Essas substâncias poliméricas, também chamadas de glicocalix, são produzidas principalmente em função do microecossistema, sendo esse mecanismo de formação de polissacarídeos, muitas vezes influenciado pelas dificuldades de sobrevivência encontradas pelas bactérias, as quais aumentam a síntese desses

polímeros com a finalidade de reter nessa matriz nutrientes necessários para a multiplicação e formação de microcolônias. Esse estímulo, normalmente ocorre em condições de limitação de nutrientes (ANWAR et al, 1992; EDEN, 1981).

2.4.1 - Estrutura de células de um biofilme

A situação fisiológica das células de um biofilme é heterogênea e é determinada pela localização de cada célula individualmente dentro das múltiplas camadas de células que formam um biofilme. As células localizadas na superfície podem ter fácil acesso a nutrientes, incluindo oxigênio e tem menores problemas com a eliminação de metabólitos de excreção, são metabolicamente ativas e com tamanho normal, tendo propriedades muito similares àquelas das células planctônicas. As camadas de células envolvidas na matriz de glicocalix têm provavelmente menor atividade metabólica, porque o acesso a nutrientes essenciais, incluindo oxigênio, é deficiente, além de problemas de acúmulo de metabólitos de excreção ao seu redor. As células envolvidas no biofilme estão em estágio de dormência e são provavelmente menores que as células da superfície por não estarem envolvidas em processo de divisão. Já as células planctônicas não tem problemas com o acúmulo de metabólitos porque os produtos de excreção são removidos do meio, entretanto, elas estão sujeitas a vários estresses físicos, químicos e biológicos, sendo vulneráveis a agentes antimicrobianos (ANWAR et al, 1992). Em função da sua baixa taxa de crescimento, essas populações sésseis, são ditas serem metabolicamente inativas em relação às suas células planctônicas. Essas células sésseis não permanecem estáticas, mas exibem uma adaptável resposta fenotípica ao meio (HOYLE et al, 1990 citado por WIRTANEN & SANDHOLM, 1992b).

A adesão em superfície inerte ocorre primeiro pela deposição de matéria orgânica, formando uma camada na qual as bactérias envolvidas no meio se associam (DUNSMORE & BATES, 1982). A variação na natureza, quantidade, forma e distribuição das células e de outras substâncias envolvidas tais como características hidrofílica e hidrofóbica dos polímeros além de material capsular, formando camadas externas às células, podem afetar a interação entre a superfície e a bactéria, facilitando a adesão (FIRSTENBERG-EDEN, 1981).

2.4.2 - Características da matriz de adesão

A natureza das fibras de adesão não tem sido claramente determinada e parece depender da natureza do microrganismo. Essas fibras, substâncias poliméricas extracelulares que formam o glicocalix no processo de adesão são polissacarídeos, os quais podem conter componentes lipídicos e protéicos (FLETCHER, 1980 citado por HERALD & ZOTTOLA, 1988b). Para FLETCHER & FLOODGATE (1973 citado por SCHWACH & ZOTTOLA, 1982) as fibras formadas em bactérias Gram negativas de origem marinha são principalmente polissacarídeos ácidos, sendo esses componentes ácidos também identificados por HERALD & ZOTTOLA (1988c) como o principal material de adesão ao redor das células de *Pseudomonas fragi*, observados através de microscopia eletrônica de transmissão. Já em bactérias Gram positivas, polissacarídeos ácido e neutro covalentemente ligados ao peptidoglicano são comuns e são considerados como componentes da parede celular (HANDLEY et al, 1988).

Os polissacarídeos, que formam esse glicocalix produzido por células em biofilmes, são carregados negativamente e funcionam, muitas vezes, como uma resina de troca iônica, ligando moléculas que tentam penetrar nas células dos biofilmes, criando um microecossistema protegido dos agentes externos (ANWAR et al, 1992).

A nível molecular, tanto a natureza do constituinte de uma unidade monomérica, quanto a estrutura da cadeia e a ocorrência e distribuição das cargas, influenciam a conformação dos polímeros e suas interações com outras moléculas e as superfícies, influenciando portanto as propriedades de adesão. O aumento intramolecular da repulsão estende a cadeia de polímero, alterando sua interação com o solvente circundante, com a superfície sólida e com outros componentes (LEWIS et al, 1989).

Segundo ANWAR et al (1992) é extremamente difícil tirar conclusões gerais da influência da superfície sobre a taxa de crescimento das células de um biofilme porque os resultados frequentemente dependem da natureza do organismo, espécie e concentração do substrato e da natureza da superfície sólida.

A composição da substância que envolve um biofilme pode ser determinada pela composição do meio onde este se forme, podendo esse parâmetro, definir a resistência das bactérias envolvidas a determinados agentes antimicrobianos.

Estudos clínicos revelam que a restrição da disponibilidade de certos nutrientes essenciais influenciam a fisiologia de bactérias patôgenicas e podem afetar a sensibilidade destas a antibióticos (ANWAR et al, 1992). BROWN (1969 citado por ANWAR et al, 1992) afirma que o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* em condições de esgotamento de magnésio resulta em aumento da resistência desse organismo a polimixina B, sugerindo que alterações na composição do envoltório das células podem causar alterações na susceptibilidade do microrganismo frente a antibióticos. Para ANWAR et al (1992) é importante identificar o meio estressante que provavelmente influencie a fisiologia da bactéria "in vivo", de modo que esta possa ser incorporada ao modelo experimental para definir a interação da bactéria do biofilme com agentes antimicrobianos.

Os biofilmes protegidos por uma matriz de polissacarídeos geram, portanto, uma comunidade encapsulada e protegida de células onde as condições estressantes são reduzidas drasticamente, dificultando a ação de agentes antimicrobianos químicos, podendo tornar sob certas condições, as técnicas de desinfecção ineficientes para uso em indústrias de alimentos (COSTERTON, 1990; ZOTTOLA, 1990).

2.4.3 - Parâmetros que influenciam o mecanismo de adesão

LEWIS et al, (1989) estudaram *Acinetobacter*, isolado de granja de leite, quanto a quantidade de polímeros secretado por esse microrganismo na adesão em superfície de aço inoxidável, em relação aos efeitos da temperatura, pH, força iônica e concentração de ions cálcio e magnésio nas células aderidas, concluindo que a temperatura e o pH são parâmetros importantes no controle da adesão, sendo os efeitos da força iônica pequenos e não significativos na associação da bactéria com a superfície de aço inox. Já os efeitos dos ions cálcio e magnésio foram comprovados no experimento estarem envolvidos na adesão de *Acinetobacter* à superfície de aço inox, já que uma maior eliminação da adesão ocorreu em amostras tratadas com sequestrantes desses minerais.

A adesão de microrganismos avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada por ZOLTAI et al (1981) em diferentes superfícies tendo leite como substrato. Para o autor *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus lactis*,

Streptococcus cremoris e *Lactobacillus bulgaricus* aderem em superfície de vidro e aço inoxidável através de pequenas forças, conforme a primeira fase da adesão descrita por MARSHALL (1971). Já *Pseudomonas fragi* além da afinidade com a superfície, por forças de atração, forma material fibroso que se estende da célula a essa superfície, aumentando essas estruturas de adesão com o tempo de contato prolongado. Para o autor, estas estruturas de adesão, sintetizadas pelo microrganismo em tempos de contato mais extensos, seriam estruturas típicas da segunda fase do processo de adesão descrito por MARSHALL (1971).

Outros fatores como meio de crescimento, temperatura e pH podem também facilitar a adesão. Segundo HERALD & ZOTTOLA (1988b), *Listeria monocytogenes* isoladas de queijo podem aderir à superfície de aço inox a diferentes pH e temperaturas dentro de sua faixa ótima de crescimento, através da formação de fibras de adesão que ocorrem por combinação de efeitos da extensão do tempo de incubação, temperatura e pH. Observações realizadas por FLETCHER (1980) e STANLEY (1983 citados por HERALD & ZOTTOLA, 1988b) indicam que se as bactérias, envolvidas no processo de adesão, encontrarem pH e temperatura na faixa ótima para o seu crescimento, estas se envolvem nesse mecanismo de aderência mais facilmente, independente de flagelos e tipo de microrganismos envolvidos.

Para SPEERS & GILMOUR (1985) tanto as células viáveis como as não viáveis se envolvem 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 tem maior facilidade para dispersão na fase de enxague da limpeza. Da mesma forma as superfícies com carga neutra como o aço inoxidável e com características hidrofílicas favorecem uma maior adesão de microrganismos (FLETCHER & LOEB, 1979).

2.4.4 - Estrutura flagelar no mecanismo de adesão

A influência dos flagelos no processo de adesão tem sido extensamente discutida (MEADOWS, 1971; NOTERMANS et al, 1979; FARBER & IDZIAK, 1984; HERALD & ZOTTOLA, 1988b) havendo uma controvérsia sobre a participação deste componente celular no mecanismo de adesão, uma vez que a maioria dos experimentos

estudaram microrganismos com diferenças morfológicas e fisiológicas. Para McSWEEGAN & WALKER (1986 citado por HERALD & ZOTTOLA, 1988b) o flagelo na adesão de microrganismos contribui no transporte ativo dessas células bacterianas em superfícies, podendo favorecer a adesão, como demonstrado no caso da *Escherichia coli* K12, um mutante com e sem flagelo, com uma maior capacidade de adesão observada na forma flagelada desse mutante. O flagelo pode facilitar inicialmente a adesão de microrganismos, mas o movimento rotatório desse componente celular pode também, segundo esse autor, impedir por algum tempo esse mecanismo de aderência. Assim, a importância do flagelo não pode ser julgada quando se comparam bactérias de linhagens diferentes, uma vez que a habilidade da adesão depende também de outros fatores, como a capacidade de produzir muco e a susceptibilidade da bactéria com a superfície (EDEN, 1981).

2.5 - EFEITO DE AGENTES QUÍMICOS SOBRE BIOFILMES

Vários pesquisadores têm estudado os efeitos de agentes de limpeza e sanificação em biofilmes aderidos a diferentes tipos de superfícies, demonstrando que a eficiência da remoção desse microecossistema é influenciada pela idade do biofilme, condições fisiológicas das bactérias envolvidas, além de fatores como meio de crescimento, temperatura e pH (KRYNSKI et al, 1992; WIRTANEN & SANDHOLM, 1992b; LEE & FRANK, 1991; ZOTTOLA, 1990; HERALD & ZOTTOLA, 1988b; STONE & ZOTTOLA, 1985).

Diferentes agentes químicos de limpeza tem sido utilizados para remoção de biofilmes em diferentes superfícies, sendo a eficiência desses agentes dependente da natureza dos compostos utilizados, associada ao tipo de superfície e microrganismos envolvidos, não sendo esses agentes de limpeza muito eficientes por si só. Segundo KRYNSKI 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 detergente enzimático são eficientes somente na remoção de organismos aderidos a superfície de aço inox, o mesmo não ocorrendo em superfície de poliéster/poliuretano, onde nenhum detergente foi efetivo quando utilizado sozinho, havendo necessidade do uso de sanificação para uma remoção adequada.

Já para WIRTANEN & SANDHOLM (1992a) biofilmes de *Pseudomonas fragi*, *Enterococcus hirae*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* formados em superfície 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 uma maior quantidade de glicocalix após os tratamentos, dificultando posteriormente uma completa remoção dessas bactérias aderidas.

As concentrações dos agentes sanitizantes tais como hipoclorito de sódio, iodóforo e amônio quaternário, variam em função da superfície para eliminação de *Listeria monocytogenes* em biofilmes, sendo que concentrações menores de sanitizantes são necessárias em superfícies não porosas como aço inoxidável e vidro do que em superfícies porosas como polipropileno e borracha. A eficiência desses sanitizantes, também pode ser afetada pela temperatura, uma vez que há necessidade de uma maior concentração desses agentes a 4°C que a 20°C para a remoção desse microrganismo (MAFU et al, 1990). Já um efeito contrário, quanto ao tipo de superfície, foi observado por CZECHONSKI (1990) que estudou o efeito de agentes sanitizantes (hipoclorito, iodóforo, mistura de halogênio como cloro e iodo) em limpeza CIP sobre biofilmes de *Yersinia* e *Salmonella* em superfície de aço inoxidável, teflon e borracha. Este autor afirma que esses microrganismos sobrevivem ao tratamento sanitizante em superfície de aço inox melhor que em superfícies de teflon e borracha, sendo a *Salmonella* mais resistente ao tratamento que a *Yersinia*. Dos sanitizantes utilizados, a mistura de halogênios removeu um maior número de células com menor concentração de sanitizante em menor intervalo de tempo.

KRYSINSKI et al (1992) reportaram que concentrações de 200 ppm de cloro ativo e amônio quaternário ou 25 ppm de iodóforo são suficientes para eliminar células planctônicas de *Listeria monocytogenes*, mas a mesma concentração não foi suficiente para eliminar essas bactérias aderidas à superfícies plásticas e de aço inox, mesmo quando o tempo de exposição aumente de 30 segundos para 10 minutos. Para os autores, compostos de amônio quaternário ácido, dióxido de cloro e ácido peracético são os mais efetivos biocidas para organismos aderidos, seguidos das misturas de halogênios e ácidos aniônicos, sendo menos efetivo o cloro, iodóforo e amônio quaternário neutro, os quais são os mais utilizados nas indústrias de alimentos.

A idade do biofilme para muitos autores determina a eficiência de uma limpeza e sanificação (FRANK & KOFFI, 1990; LEE & FRANK, 1991; WIRTANEN & SANDHOLM, 1992b; ZOLTAI et al, 1981). Para LEE & FRANK (1991) a adesão de *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável foi tanto maior quanto mais velho o biofilme, uma vez que esse microrganismo apresentou 100 vezes mais resistência em biofilmes de 8 dias em relação ao de 4 horas, quando exposto a 200 ppm de hipoclorito de sódio por 30 segundos. Ambas superfícies com células aderidas, expostas a inativação térmica, apresentaram maior eficiência à temperatura de 72°C/1min. que aquelas tratadas a 65°C/5 min., eliminando tanto o biofilme de 4 horas quanto o de 8 dias. A associação de sanificação com hipoclorito de sódio, variando de 50 a 200 ppm e inativação térmica demonstra que um tempo de 30 segundos a 72° C necessita de somente 50 ppm de cloro por 30 segundos, sendo a temperatura de 65° C no mesmo tempo menos eficiente, necessitando de 200 ppm de cloro para completa eliminação do biofilme. Estas observações concordam com aquelas de WIRTANEN & SANDHOLM (1992b) de que biofilmes mais velhos produzidos em superfícies de aço inoxidável podem oferecer resistência a agentes desinfectantes a base de cloro.

A relação existente entre temperatura e sanificação também foi estudada por FRANK & KOFFI (1990) na adesão de *Listeria monocytogenes* em vidro, concluindo que 70°C/5min. não é efetivo na inativação dessa bactéria, entretanto uma sanificação por 5 minutos posterior a esse tratamento reduz a população a níveis não detectáveis, enquanto que somente o tratamento térmico foi suficiente para a eliminação das suas células planctônicas. Para esses autores a adesão seguida de crescimento determina o desenvolvimento de uma resistência adicional, indicando que o crescimento na forma de adesão tem marcada influência na resistência térmica de microrganismos.

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 que em caldo de carne, sendo o biofilme formado em ambos os casos resistentes à sanificação (WIRTANEN & SANDHOLM, 1992b). Estudos sobre o efeito do leite e creme de leite na resistência das bactérias, em teste de suspensão e superfície, indicam que o leite tem um efeito protetor somente em teste de superfície, enquanto o creme apresenta um efeito protetor moderado em testes de suspensão e completa proteção em teste de superfície (MATTLA et al, 1990).

2.5.1 - Limpeza CIP para avaliação de microrganismos aderidos

A complexidade de um sistema de equipamentos para tratamento e processamento de leite deve ser levada em consideração quando da escolha dos métodos de limpeza e sanificação a serem utilizados nos estabelecimentos de tratamento de leite. Segundo ZOTTOLA (1990) a remoção de microrganismos aderidos em superfícies inertes pode ou não ser feita através de métodos comuns de limpeza e sanificação, dependendo da complexidade do sistema.

A eficiência do processo de limpeza CIP em sistema de tratamento térmico de leite foi avaliado por MATTILA et al (1990) utilizando microrganismos obtidos em diferentes pontos da linha de processamento, isolados após o procedimento de limpeza. Esses microrganismos, testados pelos métodos de superfície e suspensão, indicaram que em teste de suspensão tanto agentes de limpeza quanto sanificantes foram eficientes para as espécies de microrganismos testados em teste de suspensão, ao contrário dos resultados obtidos no teste de superfície onde tanto os agentes de limpeza quanto sanificantes não foram efetivos para os mesmos microrganismos. A eficiência no procedimento de higienização para sistema de leite foi também, avaliada por STONE & ZOTTOLA (1985) que estudou a limpeza tipo CIP seguida de sanificação em sistema piloto fechado para leite. Suas observações, avaliadas através de microscopia eletrônica, indicaram uma remoção inadequada de células de *Pseudomonas fragi* aderidas em pequenas placas de aço inoxidável após tratamento com detergente alcalino e ácido e sanificação com hipoclorito de sódio.

A recomendação de um tratamento prévio ao processamento seja com vapor fluente ou agentes químicos adequados tem sido indicada para sistemas contínuos de pasteurização de leite envolvidos em longos períodos de operação (DAMEROW, 1993), porém problemas de adesão de microrganismos podem ocorrer nesses sistemas com tempo de operação de até 12 h, quando a carga de microrganismos do leite inclui altas contagens de termodúricos. Esse problema de adesão de microrganismos em pasteurizador, provocado por altas contagens de termodúricos pode ser amenizado ou mesmo resolvido quando se utiliza uma interrupção da operação após 4 a 6 h de pasteurização para um ciclo de limpeza e desinfecção do sistema (HUP et al, 1979; BOUMAN et al, 1982; VAN DEN BERG, 1986).

A eficiência do procedimento de limpeza é fundamental no controle de microrganismos aderidos, uma vez que limpezas inadequadas podem interferir na ação de sanificantes, dificultando a eliminação das bactérias remanescentes aderidas nas superfícies de equipamentos de alimentos, servindo estas como fonte de contaminação em processamentos subsequentes (CZECHOWSKI, 1990; HERALD & ZOTTOLA, 1988b; STONE & ZOTTOLA, 1985). Para KRYSINSKI et al (1992), pesquisas são necessárias a partir de novos produtos químicos ou diferentes combinações dos produtos já existentes, para se encontrarem sanificantes mais eficientes na redução de biofilmes formados em equipamentos de indústrias de alimentos.

2.6 - *Streptococcus thermophilus*

2.6.1 - Histórico

O *Streptococcus thermophilus* foi identificado pela primeira vez em iogurte e recebeu o nome de *Micrococcus B* (1905), *Streptococcus lebens* (1906), *Streptococcus* (1907), *Diplostreptococcus* (1908). Posteriormente Orla-Jensen (1919) designaram - no de *Streptococcus thermophilus*. Outros nomes, como *Streptococcus lacticus thermophilus* (1933) e *Diplostreptococcus yogurt* (1948), provavelmente referiam-se também a *Streptococcus thermophilus* (RASIC & KURMANN, 1978).

Mesmo sendo o *Streptococcus thermophilus* um microrganismo bastante utilizado na fabricação de queijos e outros produtos fermentados, este tem sido pouco estudado em relação aos estreptococos lácticos. Segundo HUTKINS & MORRIS (1987) somente a partir de 1980 uma maior atenção tem sido dada ao estudo detalhado das características bioquímicas deste microrganismo.

O gênero *Streptococcus* foi classificado, pela primeira vez por SHERMAN (1937), em 4 grupos distintos: grupo piogênico, viridans, láctico e enterococos. Tal distinção foi baseada em características fisiológicas de crescimento entre elas: crescimento a 10 e 45°C, sensibilidade a 60°C/30 min., crescimento a pH 9,6 e em leite com 0,1% de azul de metileno. Foram incluídos no grupo láctico os *Streptococcus lactis* e sua *subsp. diacetylactis* além do *Streptococcus cremoris*,

também conhecidos como grupo dos estreptococos láticos. Já o *Streptococcus thermophilus*, mesmo sendo usado para fermentação lática, não foi incluído neste grupo por possuir características fisiológicas diferentes dos estreptococos láticos, fazendo parte, juntamente com o *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*, do chamado grupo viridans.

Posteriormente outras classificações foram propostas como a de Sharpe (1976), sendo que, na última edição do Manual Bergey (SNEATH et al, 1986), o gênero *Streptococcus* inclui os grupos piogênico, oral, enterococos, lático, anaeróbio e outros estreptococos não agrupados como o *Streptococcus thermophilus*, devido as suas distintas características.

Pouco se sabe sobre a ecologia dessa espécie de *Streptococcus*, não sendo conhecido o seu habitat. Pode ser facilmente isolado de leite, principalmente tratado termicamente, e de seus utensílios de manuseio, não sendo encontrado em outras fontes como vegetais verdes e materiais clínicos, como ocorre com as outras espécies de *Streptococcus* (HUTKINS & MORRIS, 1987).

2.6.2 - Características do microrganismo

O *Streptococcus thermophilus* pertence ao grupo dos cocos Gram positivos. Imóvel, suas células variam de esféricas a ovóides, medindo de 0,7 a 0,9 microns de diâmetro, normalmente agrupadas aos pares a longas cadeias. Conforme descrito no Manual Bergey (SNEATH et al, 1986), o *Streptococcus thermophilus* pode apresentar segmentos irregulares e células isoladas em crescimento a 45°C. Essa espécie de estreptococo assim como os estreptococos láticos são microrganismos altamente adaptado ao leite, seu melhor meio para crescimento.

Este microrganismo fermenta poucos açúcares dentre eles sacarose e lactose. Estes dissacarídeos são metabolizados em preferência aos monossacarídeos, podendo a fermentação ser 2 a 4 vezes maior em meio contendo lactose do que quando a glicose é usada como única fonte de carbono. Quando o crescimento ocorre a partir da lactose, a glicose é fermentada a ácido lático e a galactose se acumula no meio. Este microrganismo somente fermenta a galactose quando a lactose é limitante (SNEATH et al, 1986; DAVIS & LAW, 1984; HUTKINS & MORRIS, 1987; FOX, 1987).

O acúmulo de galactose no meio pode, segundo MARSHALL (1987) e CERNING et al (1988), ser usado pelo *Streptococcus thermophilus* para a síntese de polímeros, os quais, em geral, contem na sua composição glicose, galactose e ramnose. Esses polímeros podem ser produzidos em maior quantidade quando a bactéria cresce a temperaturas mais baixas. Polímeros contendo galactose são comuns em muitas gomas e linhagens desse microrganismo, com características de boa produção dessas substâncias, muitas vezes são utilizadas como fermento em produtos de leite fermentado, com a finalidade de estabilização, controle de acidez e também como espessantes.

O *Streptococcus thermophilus* é metabolicamente inativo em relação a maioria dos atributos utilizados para sua identificação, tendo portanto várias propriedades diferentes em relação aos outros membros do gênero (SHERMAN, 1937). Essa espécie de *Streptococcus* não produz amônia a partir da arginina e não cresce em ágar contendo bile a 40%. Cresce em caldo com 2,5% de NaCl mas não com 4%. Não cresce em pH 9,6 ou em leite com 0,1% de azul de metileno. O enriquecimento é obtido em leite incubado a 45-50°C. A diferenciação desta espécie de outras do gênero, é feita pelo rápido crescimento em "litmus milk" incubado a 45°C e pelo não crescimento em ágar bile, o que o separa dos *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinus* (SNEATH et al, 1986).

Ao contrário do que sugere o nome, *Streptococcus thermophilus* não é considerado um microrganismo termófilo, uma vez que não cresce a 55°C, temperatura normalmente utilizada para contagem de bactérias termófilas. É considerado um microrganismo termodúrico por sobreviver às temperaturas utilizadas na pasteurização. Certas linhagens sobrevivem ao tratamento térmico de 80°C/15 min. ou mesmo 85°C/20 a 30 min (RASIC & KURMANN, 1978). Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 40-45°C, tendo crescimento limitado a temperaturas inferiores a 19°C. Distingue-se dos estreptococos láticos por ter sua temperatura máxima de crescimento a 52°C, não crescendo a 53°C, porém sobrevive a temperatura de 65°C/30 minutos (SNEATH et al, 1986; ROBINSON, 1987).

Essa espécie de *Streptococcus* pode ser identificada pelo crescimento rápido a 45°C e ausência de crescimento a 10°C. A temperatura e valor nutricional do meio de cultura influenciam a morfologia desta espécie de microrganismo, que por ser altamente especializado, cresce muito bem em leite a 45°C, formando pequenas

cadeias, enquanto a 30°C muitas linhagens aparecem como diplococos, podendo formar longas cadeias em leite com alta acidez. Em caldo, há uma maior tendência a formação de cadeia, sendo estas mais longas a temperaturas acima de 45°C do que aquelas que ocorrem a 30°C. Essa morfologia pode ser acentuadamente afetada pela presença de antibióticos, quimioterápicos e sanificantes eventualmente presentes no leite (RASIC & KURMANN, 1978).

Em meio sólido esse microrganismo, normalmente, apresenta células muito irregulares, dilatadas, pontiagudas e frequentemente como bastonetes. Cocos anormais podem também ocorrer devido às contínuas repicagens em superfície de meios de cultura. O crescimento em meio sólido aparece como pequenas colônias em forma de pontos. Uma característica geral dessa espécie é sua baixa viabilidade em meios artificiais, sendo facilmente perdida se repicagens em leite não forem introduzidas entre as inoculações em ágar (RASIC & KURMANN, 1978).

O *S. thermophilus*, como outras bactérias lácticas é homofermentativo e produz 85 a 98% de ácido láctico da lactose, além de pequenas quantidades de outros compostos. Em leite produz 0,6-0,8% L (+) ácido láctico, podendo algumas linhagens produzir até 1%. As proporções e composição dos subprodutos dependem das condições culturais e propriedades intrínsecas das linhagens. Em meio glicosado, com pH controlado, o *Streptococcus thermophilus* produz anaerobicamente ácido acético e fórmico, CO₂, etanol e acetoina além do ácido láctico. Em leite produz ácidos voláteis tais como: fórmico, acético, butírico, isovalérico e capróico, acetoina, pequenas quantidades de acetaldeído e acetona, etanol e butanona-2, podendo algumas linhagens produzir diacetil. Embora este microrganismo fermente a lactose rapidamente, um crescimento lento pode ocorrer pela sua baixa atividade proteolítica em leite (RASIC & KURMANN, 1978).

Para DAVIS & LAW (1984) o *Streptococcus thermophilus* produz mais CO₂ do que o *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris*, quando crescem em leite, uma vez que este microrganismo é capaz de hidrolisar a uréia presente no leite produzindo NH₃ e CO₂. Estes compostos, quando em excesso, podem influir no desenvolvimento de linhagens de *Streptococcus* normalmente presentes nos fermentos mesófilos. Tanto o *Streptococcus lactis* quanto o *Streptococcus cremoris* necessitam de CO₂ para iniciar o seu crescimento e uma atmosfera contendo 10% de dióxido de carbono permite um bom crescimento e produção de ácido, enquanto quantidades excessivas podem inibir esse crescimento. Para um bom crescimento em leite, esses

estreptococos necessitam de 0,2 a 2,3% de CO₂, variando esse teor com a linhagem envolvida (MARTH, 1962).

Embora existam muitas diferenças fenotípicas e bioquímicas entre *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus salivarius*, uma nova taxonomia tem sido proposta, baseada em estudos de homologia de ácidos nucléicos e similaridade de cadeias longas de ácidos graxos que ocorrem entre essas duas espécies, colocando o *S. thermophilus* como uma sub-espécie do *S. salivarius* e portanto com uma nova nomenclatura : *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (MARSHALL, 1987).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - Microrganismo selvagem

O microrganismo selvagem, com morfologia de cocos, Gram positivo, catalase negativa, com crescimento a 45°C em 8 h, foi obtido de amostras de leite pasteurizado por processo HTST em indústria.

A cultura foi purificada em ágar M17 com incubação a 45°C em três repicagens sucessivas, sendo a cultura pura selecionada inoculada em leite desnatado reconstituído a 11%, estéril, e a partir de novo repique em leite, com 10% de inóculo, foi armazenada sem crescimento a -20°C. Novas repicagens foram realizadas em intervalos de 6 meses.

3.1.2 - Microrganismo de referência

Foi utilizado como microrganismo de referência uma cultura de *Streptococcus thermophilus* G, Visbyvac série 1000 do Laboratorium Wiesby de procedência Dinamarquesa.

Esse microrganismo, liofilizado, foi repicado em leite, conforme anteriormente citado, mantido nas mesmas condições da cultura de linhagem selvagem.

3.1.3 - Meios de cultura e diluentes

Foram utilizados meios de cultura "Plate Count Agar (PCA)", caldo "Man Rogosa Sharpe (MRS)" e caldo "All Purpose Medium with Tween (APT)", os dois últimos acrescidos de ágar para preparação do meio sólido, todos marca Difco, preparados conforme orientação do fabricante. O caldo e ágar M17 foi formulado em laboratório,

conforme recomendado por TERZAGHI & SANDINE (1975). Todos estes meios foram esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) reconstituído a 11%, esterilizado a 121°C por 10 minutos foi utilizado como meio de crescimento, repicagem e manutenção.

Para a diluição seriada das culturas foi utilizada água peptonada a 0,1%, conforme recomendado pelo "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (RICHARDSON, 1985), ou leite desnatado reconstituído a 11%, estéril.

3.1.4 - Equipamentos

Foram utilizados neste estudo equipamentos como: Microscópio modelo Jenaval - CARL ZEISS; microscópio eletrônico de varredura modelo JOLT 300 - CARL ZEISS; espectrofotômetro modelo Spectronic 20 - BAUSH & LOMB; pHmetro modelo DMPH - 2 - DIGIMED; banho maria bacteriológico modelo 102 - FANEM; banho maria modelo 169 - FABBE; agitador mecânico modelo 710 - FISATON; agitador mecânico modelo 713T - FISATON. Os demais equipamentos usados são os comuns em laboratórios de microbiologia.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Caracterização do microrganismo selvagem

3.2.1.1.- Identificação do microrganismo selvagem

Para identificação do microrganismo como *Streptococcus thermophilus* foram utilizados os testes de crescimento a 10, 20, 50, 52 e 53°C; crescimento em NaCl 2, 3 e 6,5 %; crescimento em caldo a pH 9,6; crescimento em meio bile 40%; crescimento em leite com azul de metileno a 1% indicados no Manual Bergey (SNEATH et al, 1986), além de testes para motilidade e fermentação de açúcares, conforme procedimentos recomendados por GERHARDT et al (1981).

Foram realizados também testes complementares de hidrólise da uréia, pH e temperatura de coagulação em leite e crescimento em "litmus milk".

a) Hidrólise da uréia.

Foi utilizado meio de "Christensen's Urea Agar" formulado em laboratório, conforme HARRIGAN & McCANCE (1976), exceto a glicose que foi substituída pela lactose na mesma concentração. O meio inoculado por picada de agulha foi incubado a 37°C/ 7 dias. Tubos do meio sem adição de uréia foram inoculados nas mesmas condições, para controle.

b) Avaliação do pH e tempo de coagulação em leite

Foi utilizado leite desnatado reconstituído, estéril, inoculado com 1% do microrganismo e incubado a 37 e 45°C até a completa coagulação. O pH foi monitorado em pHmetro.

c) Crescimento em "litmus milk".

Foi utilizado "litmus milk" (Difco), preparado conforme orientação do fabricante. Os microrganismos inoculados na base de 1% foram incubados a 45°C até a coagulação (HARRIGAN & McCANCE, 1976).

Todos os testes foram realizados, em triplicata, com os microrganismos linhagens referência e selvagem, obtidos a partir de 3 repicagens sucessivas em caldo M17 ou leite e incubados a 45°C por 16 h.

3.2.1.2 - Crescimento em meio sólido

As culturas dos microrganismos, linhagens referência e selvagem, crescidas em leite a 45°C/16 h, após diluições sucessivas, foram inoculadas em profundidade nos meios PCA, Agar APT, MRS e M17 com incubação a 37°C/ 48 h e 45°C/ 24 h. Foram observados número (ufc/ml) e tamanho (mm) das colônias nos diferentes meios de crescimento, em pelo menos 3 repetições do experimento.

3.2.1.3 - Curva de crescimento

Os microrganismos linhagens referência e selvagem obtidos a partir de cultura de 3 repicagens sucessivas foram inoculados em caldo M17 e incubados em banho-maria a 45°C. O crescimento foi monitorado por 7 h, em intervalos de 1 h, através de espectrofotômetro, em comprimento de onda de 650nm (KLAENHAMER & KLEEMAN, 1981). O experimento foi realizado em três repetições.

3.2.1.4 - Tempo de geração

O procedimento recomendado por HARRIGAN & McCANCE (1976) foi utilizado a partir de leite desnatado reconstituído estéril como meio de crescimento. As culturas, linhagem referência e selvagem, obtidas a partir de 3 repiques sucessivos, foram inoculadas no leite numa carga de aproximadamente 10^4 células/ml e incubadas a 45°C em banho-maria bacteriológico. O crescimento foi monitorado durante 5 h, através de contagens em meio ágar M17, em intervalos de 30 minutos a partir do tempo zero. Foram realizadas três repetições do experimento. Para o cálculo do tempo de geração foi utilizada a fórmula:

$$G = \frac{t \log 2}{\log b - \log a}$$

G - tempo de geração

a e b - número de bactérias para 2 pontos da curva na fase logarítmica

t - intervalo de tempo entre a e b

3.2.1.5 - Curva de acidificação

As culturas das linhagens referência e selvagem crescidas em 16h a 45°C foram inoculadas a 1% em 300 ml de leite em pó desnatado reconstituído, estéril. Após a homogeneização foram distribuídos 30 ml do leite inoculado por cada um dos 9 tubos. Um conjunto de tubos, para cada temperatura, foi incubado em banho maria bacteriológico a 35, 40, 45 e 50°C por 8 h. A acidificação foi monitorada em intervalos de 1 h pela acidez, titulável com NaOH a 0,11N e fenolftaleína como indicador e expressa

em % de ácido láctico, e o pH em pHmetro. (RICHARDSON, 1985; AUCLAIR, 1980). Foram feitas três repetições do experimento.

3.2.1.6. - Armazenamento a 10°C

Frascos contendo 300 ml de leite em pó desnatado reconstituído, estéril, inoculados com aproximadamente 1000 células/ml de culturas das linhagens referência e selvagem, obtidas em 16h a 45°C, foram estocados sob refrigeração por 6 dias. O número de células viáveis foi monitorado através de contagens em placas, em meio ágar M17 a 45°C/24 h, em intervalos de 2 dias por 6 dias.

3.2.1.7 - Curva de sobrevivência a 72°C.

Foi usado o método de frasco de três bocas, segundo STUMBO (1973), calculando-se o valor "D" pela fórmula:

$$t = D (\log a - \log b)$$

D = tempo de redução decimal a uma determinada temperatura;

a = número inicial de células;

b = número de células sobreviventes após tempo t;

t = intervalo de tempo de aquecimento entre a e b

Foram utilizados os seguintes procedimentos intermediários:

- a cultura do microrganismo linhagem selvagem, inoculada, em uma série de tubos, num volume de 10% em leite, foi congelada e assim mantida até a data do uso;
- para preparo da cultura para uso, o tubo, após descongelamento, era incubado a 45°C até a coagulação do leite (± 16 h) e um repique subsequente em leite foi realizado para crescimento da cultura em 8 h a 45°C;
- a cultura, assim preparada, foi utilizada para inoculação de 400 ml de leite a 72°C ± 1 em banho maria, para dar uma concentração de células de 10⁶/ml;
- as amostragens foram feitas em intervalos de 10 minutos por um tempo de 30 minutos;

- as diluições do leite amostrado foram realizadas em leite em pó desnatado reconstituído estéril, conforme observações de MAGNUS et al (1986);
- a contagem dos microrganismos sobreviventes foi feita pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando leite como meio de crescimento, em série de 5 tubos onde pelo menos 4 diluições foram inoculadas para cada tempo amostrado;
- foi utilizada a temperatura de 45°C/24 h para crescimento dos microrganismos remanescentes do tratamento térmico pelo NMP;
- os resultados foram expressos pela média de três repetições do experimento.

3.2.1.8 - Preparo do aço inoxidável para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Placas de "Petri" com ágar M17 foram inoculadas com o microrganismo linhagem selvagem por espalhamento na superfície. Pequenos pedaços de aço inoxidável, 6x6 mm tratados com NaOH a 1%, enxaguados até a neutralidade e esterilizados em autoclave a 121°C/15 min., foram sobrepostos às placas de M17 que foram acondicionadas em jarra, para obtenção de condições de microaerofilia, e incubadas a 45°C por 20 h.

Após a incubação, os pedaços de aço inoxidável foram retirados da superfície do ágar e tratados com solução 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2) e vermelho de rutênio a 500 ppm por 2 h a 4°C. Uma lavagem posterior foi realizada com tampão cacodilato por 10 minutos, em 3 repetições. Em seguida, o material foi desidratado em álcool 30, 50, 70, 90 e 100 %, com duas repetições de 5 minutos para cada concentração, uma segunda etapa de desidratação foi realizada a partir de etanol/butanol (1:1) por 10 minutos em duas repetições e finalmente em butanol puro pelo mesmo tempo. Para desidratação final das células foi utilizada a técnica do ponto crítico, seguida de metalização com carbono e ouro (HERALD & ZOTTOLA , 1988b). Os pedaços de aço inox foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura.

3.2.2 - Modelo experimental para avaliação da adesão do microrganismo selvagem.

O modelo experimental a seguir foi utilizado para avaliar a carga do microrganismo aderida e os efeitos da detergência alcalina e ácida e a sanificação sobre o biofilme formado pelo microrganismo selvagem.

O experimento foi dividido em duas fases:

- 1^a) adesão do microrganismo às placas de aço inoxidável e o efeito da **detergência alcalina e ácida** no biofilme formado em 6 h de tempo de contato;
- 2^a) adesão do microrganismo às placas de aço inoxidável e o efeito da **detergência alcalina e ácida** e da **sanificação** no biofilme formado em tempo de contato de 6 h.

3.2.2.1 - Preparo do modelo experimental

Foram preparadas placas de aço inoxidável 316, medindo 20x100 mm, com polimento sanitário (acabamento grana 180), todas devidamente numeradas, tendo a área teste delimitada por ranhura. Essas placas de aço inoxidável foram tratadas com detergente alcalino Liquibrite a 1 % , à temperatura de 68-71°C/7 min.e, após enxágüe (1 minuto) tratadas com detergente ácido Dilac-U a 1 % à temperatura ambiente, por 3 min., seguido de novo enxágüe até a neutralidade. O mesmo procedimento foi adotado para tratamento dos ganchos de fio de aço inox utilizados na fixação das placas.

Todo o material de vidro, hastes para agitação, ganchos e placas de aço inoxidável e água para enxágüe foram esterilizados a 121°C/20 min., em autoclave.

Nas bordas de um frasco de vidro de 12,5cm de altura x 13cm de diâmetro, as placas de aço inoxidável foram pendurados por ganchos, de modo que estas cobrissem toda a parede do frasco, tornando-as fixas nas devidas posições. Foi acrescentado ao frasco, assim preparado, 1500 ml de leite desnatado reconstituído, estéril, de maneira que os pedaços de aço inox permanecessem submersos no leite.

O modelo, nessas condições, foi colocado em agitação de 550 rpm em banho maria bacteriológico a 45°C (FIGURA 1).

3.2.2.2 - Método de contato para simulação da adesão em placas de pasteurizador.

O modelo acima descrito foi mantido em condições assépticas e, quando a 45°C, foi inoculado com uma carga aproximada de 100 células/ml do microrganismo selvagem. Esse sistema foi mantido, sob agitação, por um período de 6 h. As amostragens foram realizadas nos tempos 0, 3 e 6 h.

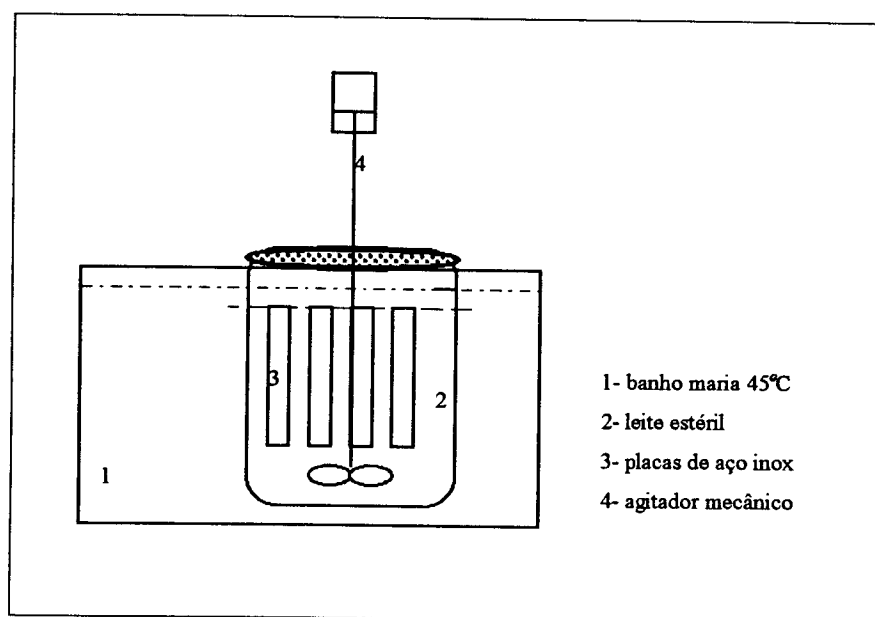


FIGURA 1: Esquema do modelo experimental utilizado para formação de biofilmes do microrganismo selvagem em placas de aço inoxidável.

3.2.2.3 - Método de detergentência e sanificação.

Para o procedimento de limpeza foi utilizado solução a 1% de detergente líquido alcalino forte (Liquibrite) com as seguintes características do fabricante: pH ~ 13 em solução a 3%, contendo além do alcali (NaOH a 44%), compostos tensoativos não iônicos, agentes sequestrantes e controladores de espuma; solução a 1% de detergente líquido ácido (Dilac U) com características do fabricante de pH 1,5 a 1,9 em solução a 1%, acidez de 41 a 45% em ácido fosfórico, contendo agentes umectantes, antiespumante, ácidos minerais (HNO_3 e H_3PO_4) e inibidores de corrosão, ambos da Diversey do Brasil. O hipoclorito de sódio com concentração 12 %, fornecido pela ADR de Campinas foi

utilizado numa concentração de 100 ppm de cloro ativo para a sanificação. A água destilada estéril foi utilizada tanto no preparo das soluções de limpeza e sanificante quanto para enxágüe em todas as etapas do experimento.

As placas de aço inoxidável foram fixadas na borda do bequer através de ganchos de aço inox, com as devidas soluções ou águas de enxágüe, de maneira semelhante ao modelo da FIGURA 1, e foram submetidos ao procedimento de limpeza e sanificação imediatamente após a retirada destas do leite, que foram tratadas conforme a sequência de etapas especificadas na FIGURA 2.

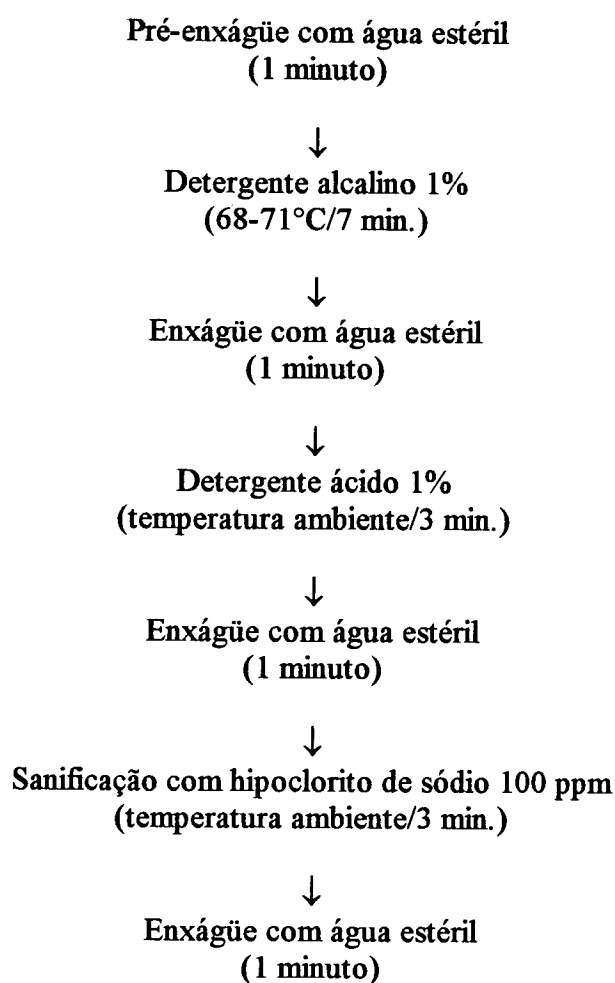


FIGURA 2: Etapas da detergentização e sanificação, temperatura e tempo de tratamento para os diferentes agentes utilizados.

As soluções dos detergentes, sanificante e água de enxágüe foram utilizadas num volume de 1800 ml, volume este estabelecido em etapas preliminares para dar um pH final dessa água de enxágüe na faixa da neutralidade. Tanto as soluções, quanto as águas de enxágüe foram utilizadas sob agitação de 900 rpm em bequer de 2000 ml com 13 cm de diâmetro.

3.2.2.4 - Amostragem para controle da carga do microrganismo.

Foram feitas amostragens nos tempos 0, 3 e 6 h para contagem da carga microbiana no leite inoculado, do microrganismo aderido nas placas de aço inox e das águas utilizadas no enxágüe. Após a amostragem a sequência de etapas da FIGURA 3 foi adotado para as contagens dos microrganismos aderidos antes e após as etapas de detergentes; para as contagens dos microrganismos aderidos antes e após a detergentes e sanitização foi adotada a sequência de etapas indicadas na FIGURA 4.

As amostragens na primeira fase foram realizadas conforme segue, adotando-se as sequências de etapas da FIGURAS 3:

zero hora: 10 ml de leite;
2 placas para contagem do microrganismo aderido;
10 ml da água de enxágüe das placas;

3 e 6 horas: 10 ml do leite;
2 placas para contagem do microrganismo aderido;
10 ml da água de enxágüe das placas;
2 placas após a detergentes alcalina;
10 ml da água de enxágüe das placas;
2 placas após a detergentes alcalina e ácida;
10 ml da água de enxágüe das placas

As amostragens na segunda fase foram realizadas conforme segue, adotando-se as sequências de etapas da FIGURAS 4:

zero hora: 10 ml de leite;
2 placas para contagem do microrganismo aderido;
10 ml da água de enxágüe das placas;

3 e 6 horas: 10 ml do leite;
2 placas para contagem do microrganismo aderido;
10 ml da água de enxágüe das placas;
2 placas após a detergência alcalina, ácida e sanificação;
10 ml das água de enxágüe das placas

Foram realizados controle de pH das águas de enxágüe, das soluções de limpeza alcalina e ácida e da solução de sanificante. Foi monitorada, também, a concentração de cloro ativo da solução sanificante, conforme metodologia indicada por RICHARDSON (1985).

3.2.2.5 - Método de contagem do microrganismo

Foi utilizada a técnica de plaqueamento em profundidade para contagem de células viáveis do microrganismo. Para contagem do microrganismo no leite, diluições seriadas de 10 ml da amostra foram realizadas em água peptonada, essas diluições foram plaqueadas com ágar M17 e incubadas a 45°C/24-48h. A mesma técnica de plaqueamento foi utilizada para contagem das células remanescentes na água de enxágüe.

Para a contagem dos microrganismos aderidos nas placas de aço inoxidável foram utilizadas duas zaragatoas de algodão por pedaço de aço inox, com esfregaço de 20 segundos para cada um e transferidas para 10 ml de água peptonada e diluições sucessivas foram realizadas quando necessário, conforme abaixo especificadas (FRANK & KOFFI, 1990). As diluições foram plaqueadas com ágar M17 e incubadas a 45°C/24-48 h.

Para as contagens nas placas de aço inox foram feitas as seguintes diluições: para adesão 1/10 (às 0 hora), 1/100 (na 3ª hora) e 1/10000 (na 6ª hora); para detergência alcalina, ácida e sanificação 1/5 (3ª e 6ª hora). As etapas de detergência e sanificação não foram realizadas nos tempos zero.

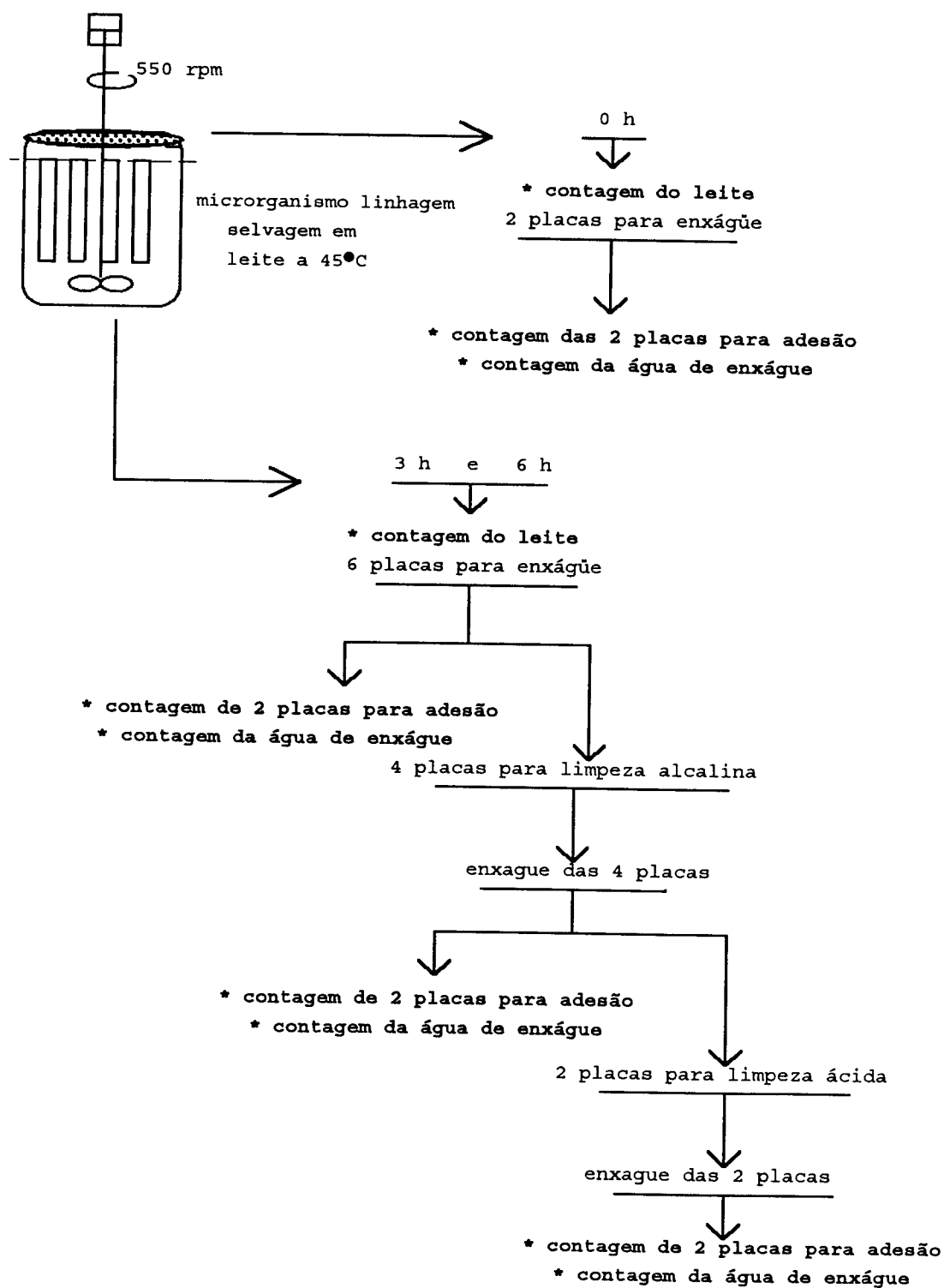


FIGURA 3: Sequência de etapas utilizadas no experimento e pontos de controle das **contagens do microrganismo (*)** do leite, da água de enxágüe e daqueles aderidos às placas de aço inoxidável antes e após a detergência alcalina e ácida.

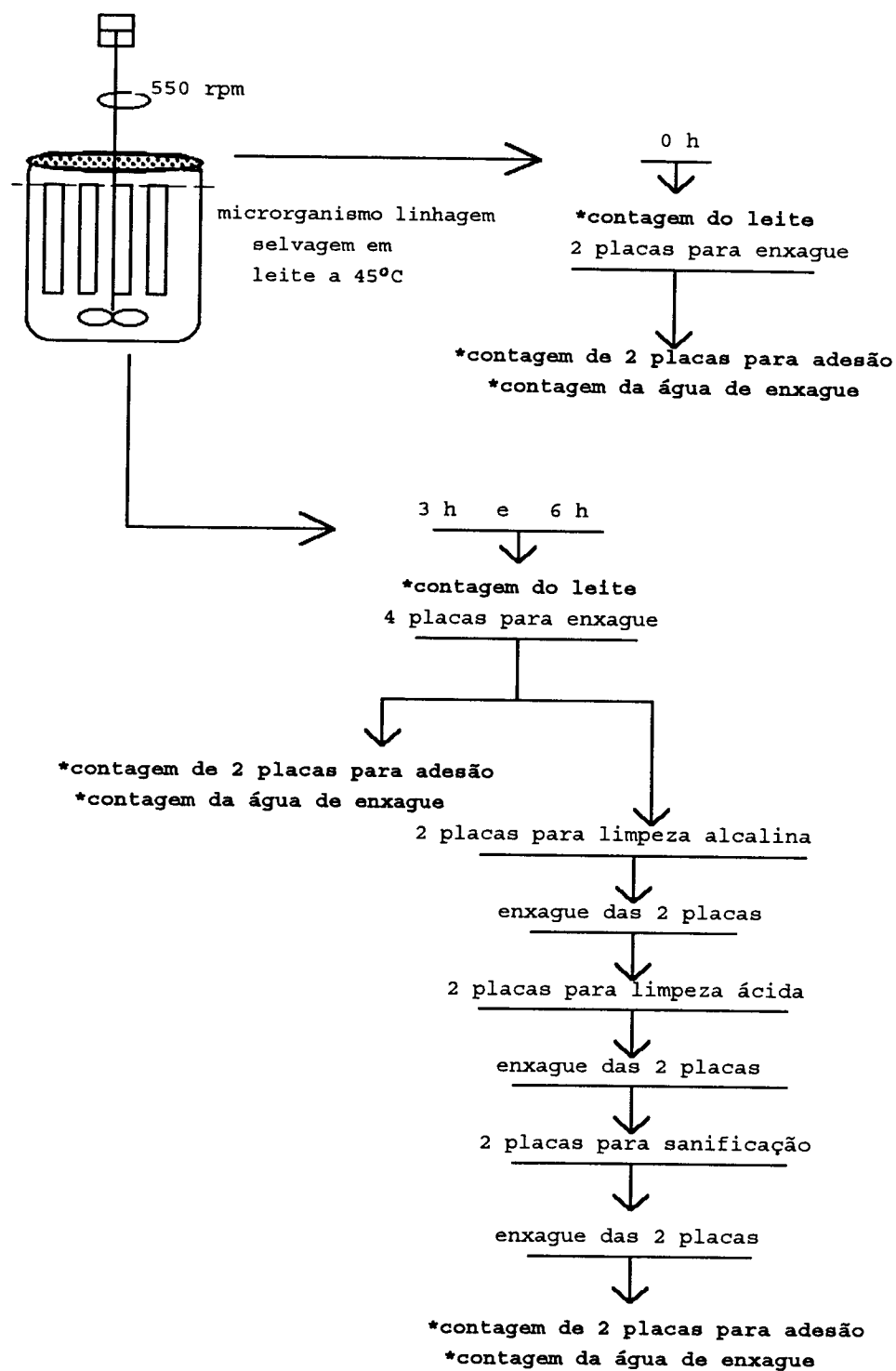


FIGURA 4: Sequência de etapas utilizadas no experimento e pontos de controle das **contagens do microrganismo (*)** do leite, da água de enxágüe e daqueles aderidos às placas de aço inoxidável antes e após a detergência alcalina, ácida e a sanificação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DO MICRORGANISMO.

4.1.1 - Identificação do microrganismo linhagem selvagem

Os resultados obtidos para o microrganismo estudado podem ser avaliados na TABELA 1. Pelos testes indicados no Manual Bergey (SNEATH et al, 1986) e, em relação, a cultura de *Streptococcus thermophilus* linhagem referência utilizada, o microrganismo selvagem isolado foi identificado como *Streptococcus thermophilus*, possuindo as mesmas características de crescimento do microrganismo de referência. Particularidades na característica de crescimento ocorreu, para as duas linhagens, nas temperaturas superiores a 45°C, ou seja 50 e 52°C, nos quais os microrganismos parecem crescer aderido à parede do tubo, formando também pingentes de crescimento a partir da superfície do caldo. Diferenças no tempo para a hidrólise da uréia ocorreram entre as duas linhagens: as alterações no meio iniciaram-se, para a linhagem selvagem, em 24 h; essa mesma alteração, para a linhagem referência, somente pôde ser observada a partir de 48 h.

Diferenças entre linhagens de uma mesma espécie podem ocorrer: como aquela de *S. thermophilus* isolada por HUP & STADHOUDERS (1979) com crescimento em meio com 3% de NaCl, quando o comum para essa espécie é de 2 % de NaCl. Porém as características de crescimento obtidas neste estudo para o *Streptococcus thermophilus* linhagem selvagem estão dentro daquelas descritas na literatura (VIEIRA, 1981; SNEATH et al, 1986).

TABELA 1: Testes de identificação realizados para o microrganismo selvagem isolado de leite pasteurizado.

Testes	<i>Streptococcus thermophilus</i> referência	Cultura selvagem
morfologia	cocos pares e cadeias	cocos pares e cadeias
Gram	+	+
catalase	-	-
fermentação	homo	homo
motilidade	-	-
crescimento: 10°C	-	-
20°C	+	+
45°C	+	+
50°C	+ ¹	+ ¹
52°C	+ ¹	+ ¹
53°C	-	-
fermentação: lactose	+	+
sacarose	±	+
maltose	-	-
crescimento: ágar bile 40%	-	-
caldo NaCl 0%	+	+
NaCl 2%	+	+
NaCl 3%	-	-
NaCl 6,5%	-	-
caldo pH 9,6	-	-
leite azul metileno 0,1 %	-	-
hidrolise uréia	+ ³	+ ²
pH após coagulação em leite: 37°C	4,87	4,95
45°C	4,84	5,03
tempo de coagulação em leite: 37°C	7 h	9 h
45°C	5 h	5 h 30 min.
crescimento em Litmus Milk	ACRp ⁴	ACRp

1 - crescimento em pingente ; 2 - início aparente em 24 h; 3 -início aparente em 48 h;
4 - A - acidificação, C - coagulação, Rp - redução parcial

4.1.2 - Crescimento em meios sólidos

As duas linhagens do microrganismo estudado (TABELA 2) apresentaram comportamento semelhante nos meios MRS e M17, tanto a 37 quanto a 45°C, embora o tamanho das colônias variasse de 2,0 mm para o meio M17 a 0,5 mm em MRS, diferença essa bastante significativa no aspecto prático. Uma diferença acentuada no número de bactérias ocorreu entre as duas linhagens no meio APT, uma vez que tanto as contagens obtidas quanto o tamanho das colônias foram diferentes para as linhagens referência e selvagem nas temperaturas de 37 e 45°C.

Os resultados das contagens obtidos para a linhagem referência nos meios APT, MRS e M17 não mostraram diferença significativa, porém foram observadas variações nos tamanhos das colônias de 1,0 mm em APT, 0,5 mm em MRS e 2,0 mm em M17, tanto a 37 quanto a 45°C.

TABELA 2 : Número de *Streptococcus thermophilus* (ufc/ml) linhagem de referência e selvagem em diferentes meios sólidos a 37°C/48h e 45°C/24h (média de 3 repetições).

meios sólidos	referência		selvagem	
	37°C	45°C	37°C	45°C
PCA	< 10	< 10	< 10	< 10
APT	3,0 x 10 ⁸ b	1,7x10 ⁸ b	< 10 ⁵ d	2,2x10 ⁴ d
MRS	3,0 x 10 ⁸ a	3,2x10 ⁸ a	3,6 x 10 ⁸ b	3,0x10 ⁸ b
M17	3,1 x 10 ⁸ c	4,0x10 ⁸ c	5,5 x 10 ⁸ c	3,7x10 ⁸ c

a - colônias medindo ~ 0,5mm

b - colônias medindo ~1,0mm

c - colônias medindo ~2,0mm

d - colônias imperceptíveis a olho nu (< 0,5 mm) em 72 h incubação.

Já os resultados obtidos para a linhagem selvagem em meio APT indicaram uma redução na contagem do microrganismo de 4 ciclos logarítmicos, fato este não

observado nos meios MRS e M17. Também uma diferença de tamanho das colônias no meio APT foi observada, havendo necessidade de extensão do tempo de incubação (48 para 72h), principalmente a 37°C, para que as colônias atingissem aproximadamente 0,5 mm em 72h, o que dificultou sua observação e contagem de forma confiável a essa temperatura. Já na temperatura de 45°C em 48 h as colônias em meio APT foram mais facilmente observadas embora uma melhor visualização das colônias ocorresse com a extensão do tempo de incubação de 24 para 72h.

Não foram observadas colônias em "Plate Count Agar" para ambas as linhagens nas temperaturas estudadas, provavelmente pela deficiência deste meio quanto os requerimentos nutricionais adequados para o desenvolvimento dessa espécie de microrganismos lático.

O meio APT, extensamente utilizado para contagem e isolamento de microrganismos láticos (KING & KOGURGER,1970; GERALDINI et al, 1979; TAMIME & DEETH; 1980; HITCHERNER et al, 1982; FOX, 1987; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992), principalmente aqueles com complexas exigências nutricionais (MARTH,1962), tem sua fonte de carbono a partir de 1% de dextrose. Também o meio MRS, um meio complexo, indicado como um dos melhores meios para bactérias láticas (GILLILAND, 1985), utiliza a dextrose numa concentração de 2%. O meio M17 largamente utilizado, principalmente pelo conteúdo de fosfato orgânico (β -glicerofosfato de sódio) na sua formulação, também indicado como um bom meio para crescimento, isolamento e contagem de *Streptococcus thermophilus* (TERZAGHI & SANDINE, 1975; BRACQUART, 1981; SINHA, 1991a e b; JORDANO et al, 1992; ONGGO & FLEET, 1993), contem lactose a 0,5% como fonte de carbono. Já o meio "Plate Count Agar", com 0,1 % de dextrose, tem uma composição pobre não só em carboidratos mas também em outros compostos essenciais para crescimento de bactérias láticas.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram uma dificuldade de crescimento das linhagens de *S. thermophilus* no meio PCA talvez pela deficiência deste, não só em nutrientes essenciais como também pela baixa concentração de glicose do meio. Já a diferença de crescimento em meio APT para linhagem referência e selvagem parece indicar uma particularidade metabólica de uma linhagem em relação a outra, uma vez que a cultura referência é composta por uma linhagem já selecionada metabolicamente para ser utilizada como fermento, bastante diferente da cultura selvagem

sem seleção alguma quanto ao seu perfil bioquímico. Os resultados obtidos para o meio MRS, embora apresentassem contagens equivalentes para as duas linhagens estudadas, parecem indicar uma acentuada influência da glicose como fonte única de carbono, uma vez que pequenas colônias se formaram nesse meio. Também a concentração da glicose pareceu contribuir para um crescimento maior da linhagem selvagem, uma vez que os meios PCA, APT e MRS, com concentrações crescentes de glicose também apresentaram contagens crescentes do microrganismo, o mesmo não ocorrendo para a linhagem referência em relação aos meios APT e MRS. O meio M17 pareceu ter uma composição mais adequada para o crescimento de diferentes linhagens de *S. thermophilus*, já que tanto as contagens quanto o tamanho das colônias foram equivalentes para ambas as linhagens, provavelmente, pela preferência deste microrganismo pela fermentação da lactose em relação a glicose.

Os meios acima citados, normalmente indicados para contagem, crescimento e isolamento de bactérias lácticas, em geral não são específicos para este ou aquele gênero de microrganismos lácticos, podendo variar seu comportamento em função das linhagens estudadas e do tipo de alimento envolvido, já que linhagens com diferentes sensibilidade podem existir (COX, 1977).

Para TINSON et al (1982a) linhagens de *S. thermophilus* crescidas em meio com lactose apresentam uma maior atividade celular da β -galactosidase do que células desse microrganismo crescidas em meio contendo glicose. A β -galactosidase, enzima predominantemente envolvida na hidrólise da lactose pelo *S. thermophilus*, tem sua atividade marcadamente aumentada após a adição de lactose no meio de crescimento. Esta indução da atividade da β -galactosidase atinge um nível 2-4 vezes maior do que aquela apresentada por células crescidas somente na presença de glicose, até mesmo quando um excesso desse açúcar é utilizado no meio de crescimento. Este comportamento é diferente daquele apresentado pelos estreptococos lácticos onde a enzima para hidrólise da lactose não é induzida até que toda a glicose do meio tenha sido utilizada.

Assim as particularidades metabólicas de crescimento do *Streptococcus thermophilus* em meios contendo glicose como fonte de carbono, têm sido pouco investigada, uma vez que este continua sendo utilizado por muitos pesquisadores na tentativa de isolamento desse microrganismo a partir de diferentes substratos, podendo ser essa a causa da dificuldade de isolamento dessa espécie de *Streptococcus*, a partir de leite, nos trabalhos realizados por GARCIA (1984) e ANTUNES (1985).

4.1.3 - Curva de crescimento

As linhagens de *S. thermophilus* estudadas apresentaram uma fase de adaptação menor que 1 h (FIGURA 5), atingindo a fase exponencial final após 3 h de crescimento produzindo a máxima densidade celular em 6 h de incubação, o que indica um rápido crescimento dessas linhagens à temperatura de 45°C. Esses nossos resultados concordam com aqueles obtidos por SINHA (1991a), que estudou 8 linhagens de *S. thermophilus*, no mesmo meio de cultura, a 42°C.

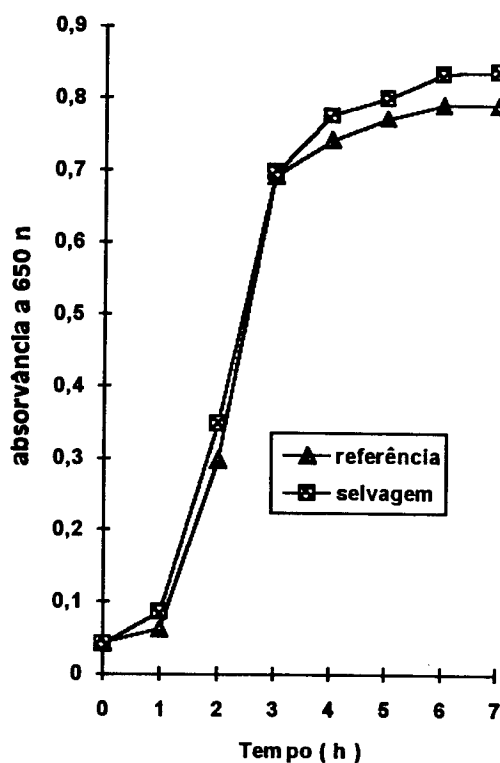


FIGURA 5: Curva de crescimento de *Streptococcus thermophilus* linhagens referência e selvagem em caldo M17 a 45°C (média de 3 repetições).

4.1.4 - Tempo de geração

Tempos de 16,5 e 15,2 minutos, respectivamente, foram obtidos para as gerações das linhagens referência e selvagem dos *Streptococcus thermophilus* estudados em leite a 45°C, valores esses bastante próximos considerando linhagens de diferentes procedências.

Tempos diferentes dos acima citados foram obtidos por RADKE-MITCHELL & SANDINE (1986) para linhagens diferentes de *Streptococcus thermophilus* em leite, com variação de 51,7 a 109,3 minutos no tempo de geração, em temperatura ótima de crescimento variando de 35 a 42°C; os menores tempos não estão necessariamente relacionados às temperaturas mais altas, podendo ocorrer linhagens com tempo de 51,7 min. com temperatura ótima de 38°C, ao passo que a 42°C pode ocorrer tempo de geração de 109,3 minutos. TAMIME & DEETH (1980) indicam um tempo de geração de 22 a 28 minutos para *Streptococcus thermophilus* em leite. Esses diferentes tempos citados e aqueles obtidos neste trabalho indicam uma grande variação de comportamento no crescimento de diferentes linhagens dessa espécie de microrganismo.

4.1.5 - Curva de acidificação

À temperatura de 35°C um comportamento distinto ocorreu nas curvas de acidificação para as linhagens referência e selvagem (FIGURA 6). A quantidade de 0,35 % de ácido láctico produzida pela linhagem referência em 8 h foi 3,18 vezes maior que aquela produzida pela linhagem selvagem, ou seja 0,11% de ácido láctico. A linhagem referência, mesmo a 35°C, coagulou o leite em 8 h, fato esse não ocorrido com a linhagem selvagem, uma vez que em 8 h um baixo teor de ácido foi produzido.

À temperatura de 40°C níveis de 0,42 % e 0,34 % de ácido láctico foram produzidos respectivamente pelas linhagens referência e selvagem produzindo a linhagem referência 1,26 vezes mais ácido do que a linhagem selvagem a essa temperatura, quantidades de ácido suficientes para provocar uma redução no tempo de coagulação dessas culturas em relação a temperatura de 35°C. Tempos de coagulação de 6 h, para linhagem referência, e 7 h para a selvagem foram obtidos a 40°C, embora quantidades

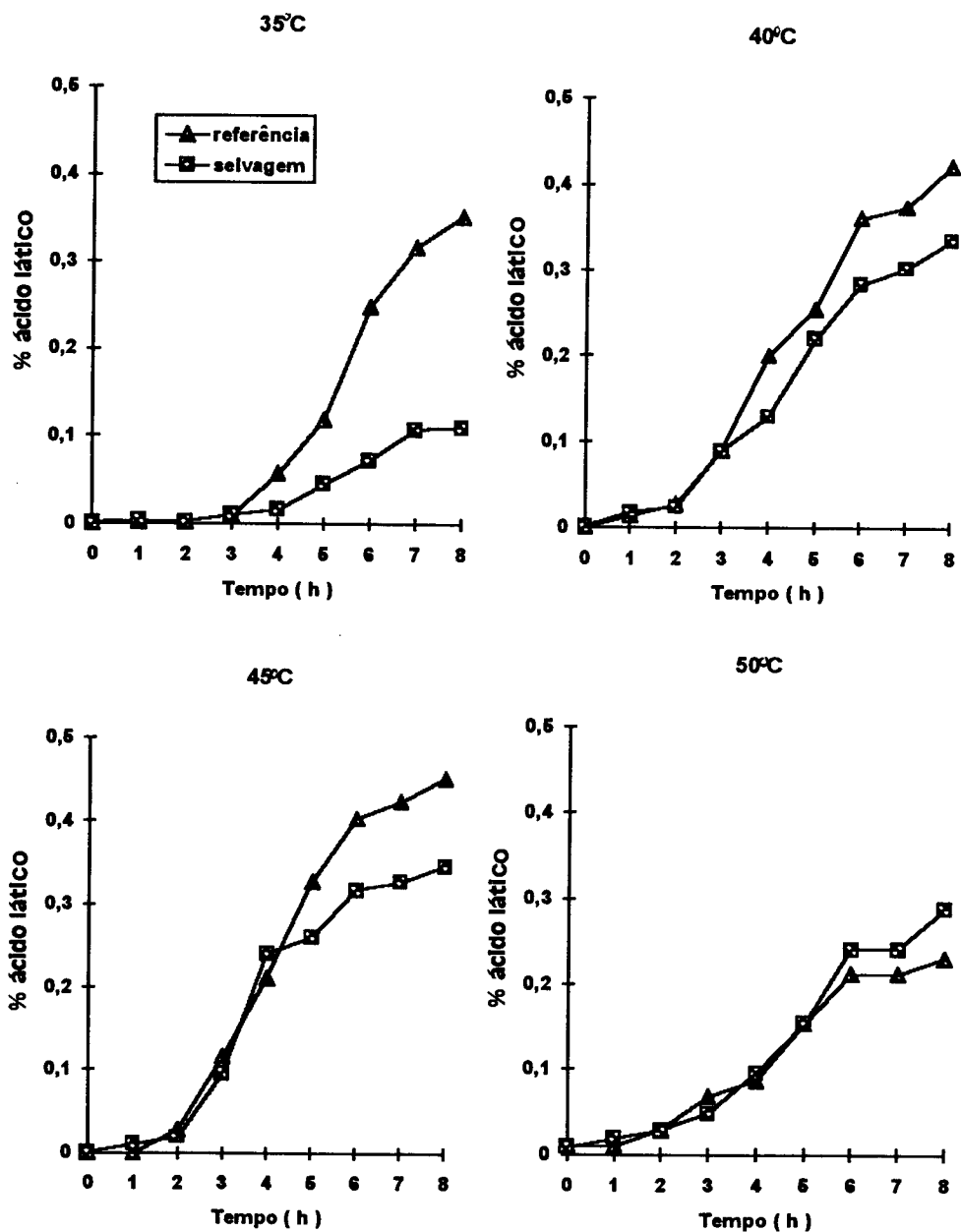


FIGURA 6: Curvas de acidificação de *Streptococcus thermophilus* linhagem referência e selvagem em leite a 35, 40, 45 e 50°C (média de 3 repetições).

de ácido estejam abaixo dos valores (0,6 %) normalmente indicados para esta espécie de *Streptococcus*; as curvas de acidificação obtidas a 40°C foram semelhantes para as duas linhagens embora o teor de ácido produzido pela linhagem referência fosse superior àquele produzido pela linhagem selvagem.

À temperatura de 45°C, de forma semelhante ao ocorrido na temperatura de 40°C, uma maior quantidade de ácido foi produzida pelas linhagens, atingindo níveis de 0,45% a 0,35 % respectivamente para linhagens referência e selvagem, quantidades essas 1,31 vezes o teor de ácido produzido por uma linhagem em relação à outra. As curvas de acidificação a 45°C apresentaram perfil diferente para as duas linhagens uma vez que para a linhagem selvagem ocorreu uma quebra na curva, a partir da 4 h de fermentação diferentemente da linhagem referência. Uma redução no tempo de coagulação em relação a temperatura de 40°C, ocorreu para as linhagens, sendo de 5 h para a referência e de 6 h para a cultura de linhagem selvagem. Pode-se observar também que, tanto à temperatura de 40, quanto 45°C, a relação de produção de ácido entre linhagem referência e selvagem foi praticamente mantida, sendo de 1,26 para 40°C e 1,31 para a temperatura de 45°C.

À temperatura de 50°C ocorreu uma inversão em relação a produção de ácido. Teor de 0,23 % de ácido láctico foi obtido para linhagem referência, valor esse inferior àquele produzido pela linhagem selvagem de 0,29 %, indicando que a linhagem referência foi mais influenciada por essa temperatura, uma vez que até então as quantidades de ácido produzidas pela cultura de linhagem referência foram maiores que aquelas obtidas para a cultura selvagem nas temperaturas de 35, 40 e 45°C. Esse mesmo comportamento foi observado para os tempos de coagulação, sendo de 8 h para a linhagem referência e de 7 h para a linhagem selvagem. As curvas de acidificação apresentaram um perfil bastante próximo para as duas linhagens, diferente daqueles obtidos nas temperaturas de 35, 40 e 45°C.

As curvas de pH obtidas em leite para as linhagens de *Streptococcus thermophilus* nas temperaturas de 35, 40, 45 e 50°C em 8 h, podem ser observadas na FIGURA 7. Diferença mais acentuada na evolução do pH, foi observada somente para a linhagem selvagem a 35°C. Nas demais temperaturas, ambas as linhagens apresentaram comportamento semelhante, principalmente a 50°C.

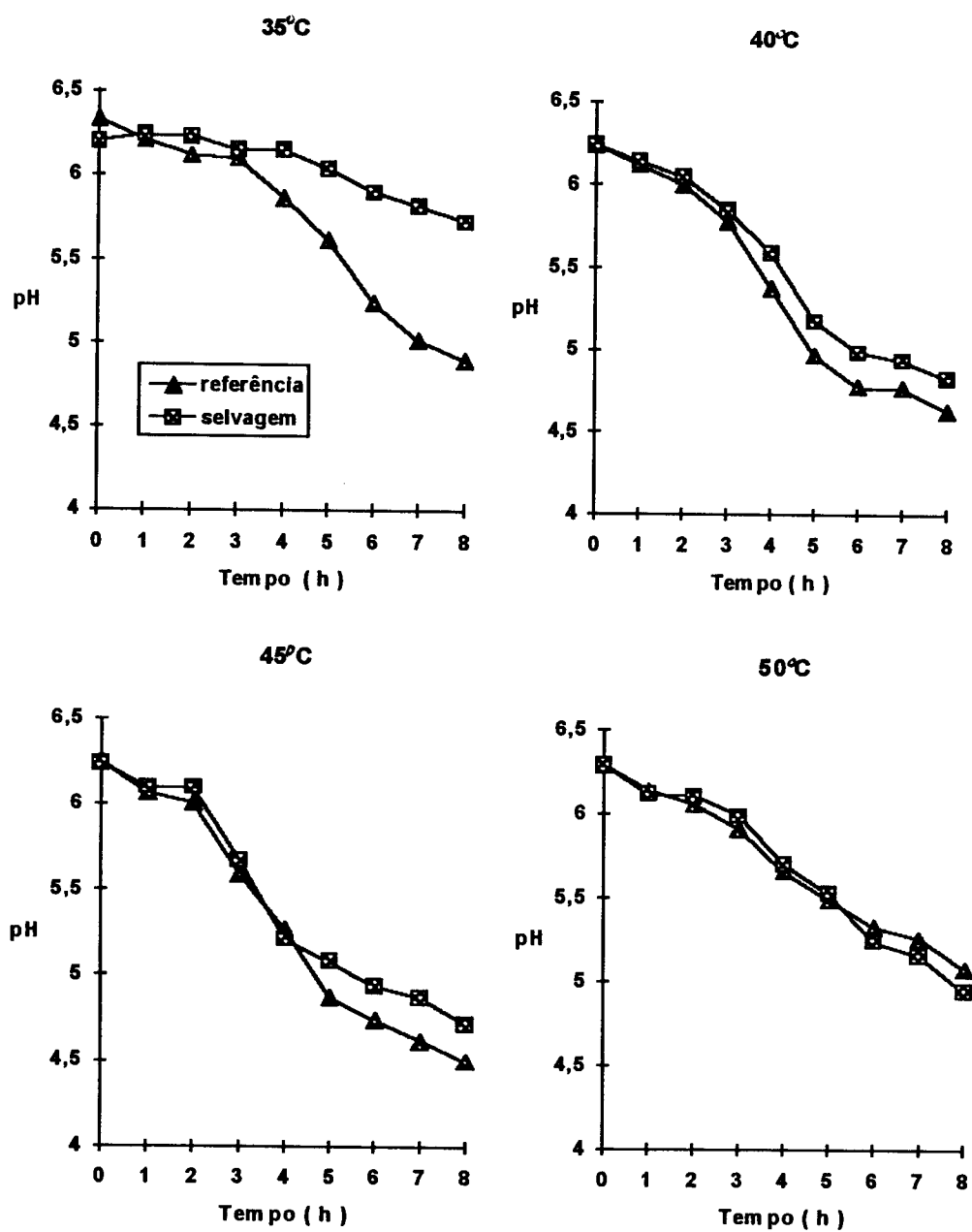


FIGURA 7: Curvas de pH de *Streptococcus thermophilus* linhagem referência e selvagem em leite a 35, 40, 45 e 50°C (média de 3 repetições).

Uma maior uniformidade na produção de ácido láctico, tanto para a cultura da linhagem referência quanto para a linhagem selvagem, ocorreu nas temperaturas de 40 e 45°C em 8 h (TABELA 3). Na temperatura de 35°C uma boa acidificação foi produzida pela linhagem referência, que com menor teor de ácido em relação às temperaturas de 40 e 45°C, coagulou o leite em 8 h de incubação. O mesmo comportamento pode ser observado também a temperatura de 50°C embora, entre as temperaturas estudadas, o menor teor de ácido tenha sido obtido para a linhagem referência a essa temperatura. Esse teor de ácido, mesmo baixo, foi suficiente para iniciar a coagulação do leite em 8h. Já a cultura da linhagem selvagem na temperatura de 35°C produziu um menor teor de ácido em relação às outras temperaturas estudadas, não ocorrendo em 8 h de incubação qualquer indicação de coagulação do leite, diferentemente da temperatura de 50°C quando o teor de ácido produzido, embora menor que os de 40 e 45°C, provocou a coagulação do leite no mesmo tempo.

Para a linhagem referência nas temperaturas testadas, foram obtidos valores de pH variando entre 5,08 a 4,50 (TABELA 3) não apresentando esta linhagem diferenças acentuadas de comportamento na evolução do pH. Já, para a linhagem selvagem, a variação do pH foi mais ampla ou seja de 5,73 a 4,72. A 35°C a alteração do pH para essa linhagem foi pequena em 8 h de incubação, valores mais alto com menor diferença entre eles ocorreram nas temperaturas de 40, 45 e 50°C. Ambas as linhagens coagularam o leite a pH $4,9 \pm 0,2$ nas diferentes temperaturas, exceto a 35°C para a linhagem selvagem.

TABELA 3: Acidez e pH de *Streptococcus thermophilus* linhagem referência e selvagem desenvolvida em leite em 8 h a diferentes temperaturas.

temperatura (°C)	referência		selvagem	
	acidez (%ácido láctico)	pH	acidez (%ácido láctico)	pH
35	0,35	4,90	0,11	5,73
40	0,42	4,63	0,34	4,83
45	0,45	4,50	0,35	4,72
50	0,23	5,08	0,29	4,95

Variações de comportamento na curva de acidificação por pH ocorrem segundo GIRRAFA et al (1993) para linhagens diferentes de *Streptococcus thermophilus* a diferentes temperaturas. Diferentes linhagens desse microrganismo quando crescem em temperaturas menores que a sua ótima de 40-45°C, são incapazes de completar o processo de acidificação, enquanto outras são altamente produtoras de ácido em temperaturas na faixa de 20-45°C.

Para HUTKINS & MORRIS (1987) vários são os fatores que influenciam o crescimento e produção de ácido pelo *S. thermophilus*, desde as particularidades da cultura, até os meios de crescimento em diferentes condições. Os baixos teores de ácido láctico produzidos pelas linhagens estudadas neste experimento, em relação aos valores de 0,6-0,8% indicado por RASIC & KURMANN (1978), podem em parte estar relacionados à utilização de leite em pó esterilizado como substrato de crescimento uma vez que compostos formados pelo tratamento térmico podem interferir no crescimento. Outro fato a ser considerado em relação ao *Streptococcus thermophilus* é a capacidade deste microrganismo hidrolisar a uréia normalmente presente no leite (8,38 mg/100ml). A amônia produzida como resultado dessa hidrólise, pode neutralizar a acidez desenvolvida, dificultando uma dosagem segura do pH e da acidez titulável, pelo que esses parâmetros não podem ser avaliados de maneira correta em cultura em leite (TINSON et al, 1982b; SPINNLER et al, 1987; HUTKINS & MORRIS, 1987).

Em nosso experimento uma quebra na curva de acidificação e pH foi observado para a linhagem selvagem do *S. thermophilus* estudado na temperatura de 45°C (FIGURA 6 e 7), e mais discretamente para as duas linhagens a 50°C. Assim o efeito da hidrólise da uréia em leite pelo *Streptococcus thermophilus*, em relação a dosagem de acidez e pH, deve ser melhor avaliado, uma vez que o início da hidrólise da uréia na linhagem referência ocorreu a partir de 48 h a 37°C, enquanto na linhagem selvagem essa hidrólise teve início em menos que 24 h (TABELA 1), indicando que talvez a produção de urease ocorra de forma mais intensa em temperaturas diferentes para as duas linhagens, fato este que pode estar relacionado aos resultados de acidificação obtidos para a linhagem selvagem em relação a linhagem referência a diferentes temperaturas.

4.1.6 - Armazenamento a 10°C

O *Streptococcus thermophilus* linhagem referência e a selvagem mostraram um comportamento distinto a temperatura de 10°C (TABELA 4), uma vez que ambas as linhagens estocadas em leite refrigerado a essa temperatura apresentaram diferentes cargas de células viáveis em 6 dias de armazenamento. A linhagem referência, pelos resultados, indicou ser mais sensível à temperatura de 10°C, uma vez que houve uma redução de 86,0 % no número de suas células viáveis durante a estocagem. Já a linhagem selvagem, nas mesmas condições, apresentou uma redução menor do número de células viáveis, da ordem de 42,9%, indicando portanto que a temperatura de 10°C interfere menos na viabilidade das células da linhagem selvagem em leite do que sobre as células da linhagem referência de *S. thermophilus*

TABELA 4: Contagens de *Streptococcus thermophilus* linhagem referência e selvagem em 0, 2, 4 e 6 dias e porcentagens de sobreviventes em leite a 10°C (média de 3 repetições).

Tempo (dias)	referência		selvagem	
	Células viáveis (ufc/ml)	(%)	Células viáveis (ufc/ml)	(%)
0	4,4x10 ³	100	6,6x10 ³	100
2	3,1x10 ³	71,6	5,7x10 ³	86,3
4	9,4x10 ²	21,5	4,3x10 ³	61,7
6	6,1x10 ²	14,0	3,8x10 ³	57,1

4.1.7 - Curva de sobrevivência a 72°C

O leite foi o meio utilizado para avaliação do *S. thermophilus* selvagem frente ao tratamento térmico, já que o microrganismo foi isolado de linha de pasteurização com aumento de contagem durante a pasteurização. A fase de crescimento da cultura indicou um fator importante na destruição térmica, como pudemos observar em muitos

testes preliminares quando utilizamos culturas repicadas e mantidas em refrigeração, onde discrepâncias e variações ocorreram nos resultados. Por isso nós optamos pelo congelamento de cultura de mesma idade, com repicagens em diferentes tubos de leite, a partir de uma mesma população, para servir de inóculo inicial para as repetições do experimento.

Os resultados da destruição térmica obtidos para o *S. thermophilus* selvagem indicaram um valor D_{72} de 7,4 minutos (DP-1,2). O desvio da linearidade na curva de sobrevivência térmica (FIGURA 8), é peculiar segundo HANSEN & RIEMANN (1963), para microrganismos não esporulados, com células agrupadas, como no caso os *Streptococcus*, que sofrem durante o tratamento térmico o efeito da temperatura em mais de uma das células da cadeia de microrganismo, provocando esse desvio.

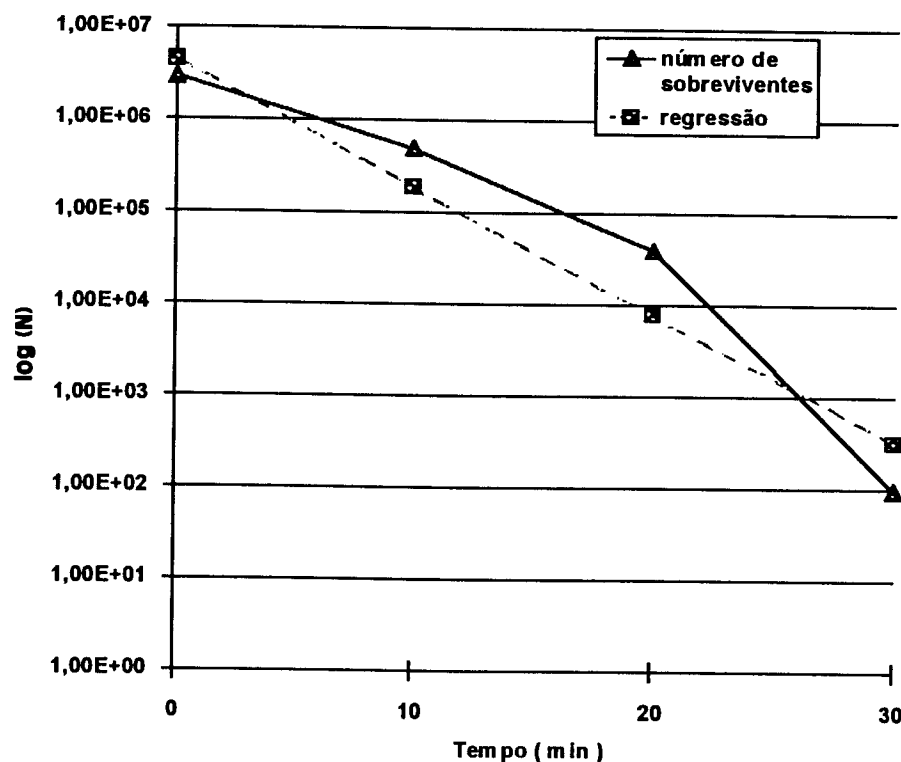


FIGURA 8: Curva do número de *S. thermophilus* linhagem selvagem sobreviventes em leite a 72°C.

4.1.8 - Formação de estruturas de adesão

A formação de estruturas de adesão pela linhagem selvagem do *Streptococcus thermophilus* aderido em placas de aço inoxidável, com tempo de contato de 20 h, pode ser observada na FIGURA 9, obtida através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A formação de substâncias que se estendem da superfície celular até a superfície da placa, evidenciam a capacidade deste microrganismo sintetizar, em 20 h, a substância necessária para provocar o efeito da adesão.

Essa técnica de microscopia eletrônica de varredura utilizando rutênio vermelho tem sido usada para localizar esses polissacarídeos ácidos, componentes principais na adesão de microrganismos, através da complexação do rutênio vermelho com grupos carbonil e hidroxil do polímero, resultando em um denso precipitado facilmente identificado por essa técnica (HANDLEY et al, 1988).

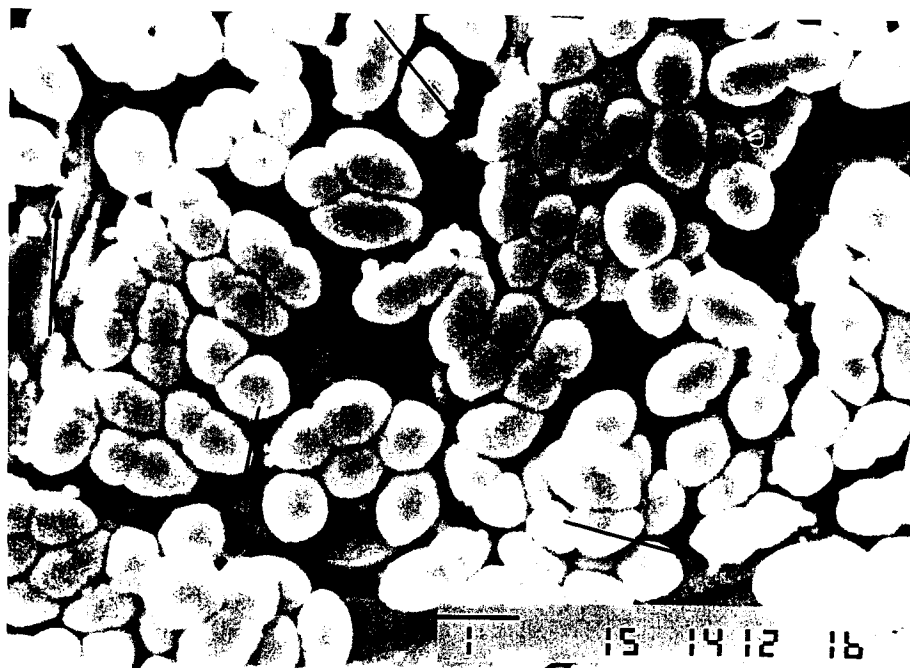


FIGURA 9: Estruturas de adesão formadas por *Streptococcus thermophilus* selvagem em superfície de aço inoxidável (x10000 - MEV)

4.2 - EFEITOS DA DETERGÊNCIA E SANIFICAÇÃO SOBRE BIOFILME ADERIDO À SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL.

A linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* aderiu às placas de aço inoxidável proporcionalmente ao aumento do número de células desse microrganismo no leite. Uma contagem média inicial no leite de 5×10^2 a 6×10^2 células/ml, obtida nas duas fases do experimento (TABELA 5 e 6) resultou, após 3 h, numa carga microbiana de 2×10^5 células/ml e, em 6 h, em até 8×10^7 a 1×10^8 células/ml no leite a 45°C. Nesses tempos de contato, as concentrações de células aderidas variaram na 3ª h de 16 a 23 células/cm² para 2 a 3×10^4 células/cm² na 6ª h, não sendo detectado adesão do microrganismo no tempo zero (FIGURAS 10 e 11).

Os resultados obtidos neste experimento indicaram que, partindo-se de uma carga microbiana de aproximadamente 10^2 células/ml no leite, um aumento de 355 vezes em 3 h ocorreu na carga do microrganismo nesse substrato, resultando em 23 células/cm² aderidas na superfície das placas. Já um aumento de 593 vezes ocorreu num mesmo tempo, partindo-se de 10^5 células/ml, aumentando o número de células aderidas nas placas em 1279 vezes, consequentemente uma colonização muito mais expressiva das placas a partir de contagem mais elevadas de células. Estas observações confirmam aquelas citadas na literatura (DUNSMORE & BATES, 1982) que a carga de microrganismo aderida é dependente, além de outros fatores, do número de microrganismos presente no meio circundante, em função do tempo de contato.

Esse aumento acentuado de células, obtido no nosso experimento, pode ser explicado pelas características de crescimento do microrganismo que atinge sua fase exponencial em 1 h de crescimento (item 4.1.3) e possuindo um tempo de geração de 15,2 minutos (item 4.1.4), rapidamente se reproduz em leite, permitindo que a colonização da superfície ocorresse em tempo relativamente curto. Uma tendência de crescimento mais acentuada da nossa linhagem selvagem foi observada, uma vez que esta linhagem produziu, em 3h, 11,8 gerações de células, enquanto DRIESSEN et al (1984) obteve em condições semelhantes um número de 8 gerações para uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus*.

Os resultados obtidos após a detergência alcalina e ácida das placas de aço inox com adesão de *S. thermophilus* selvagem, podem ser observados na TABELA 5. A

carga de microrganismo na superfície das placas após limpeza alcalina foi reduzida para níveis não detectáveis, tanto para um tempo de contato de 3h quanto de 6 h, ocorrendo portanto uma redução acentuada no número de células aderidas (FIGURA 10).

TABELA 5: Número de *Streptococcus thermophilus* em leite a 45°C, em placas de aço inoxidável antes e após a detergência alcalina (liquibrite, solução 1%, pH 12) e detergência ácida (dilac-U, solução 1%, pH 1,3) com suas águas de enxágüe (média de 5 repetições).

Etapas Testadas	médias das repetições	0 h	3 h	6 h
Leite (ufc/ml)	$\bar{x}$	6×10^2	2×10^5	1×10^8
	DP	1×10^2	1×10^5	7×10^7
Água de enxague das placas antes da detergência (ufc/ml)	$\bar{x}$	nd	7	3×10^3
	DP	—	9	3×10^3
Placas antes da detergência (ufc/cm ²)	$\bar{x}$	nd	23	3×10^4
	DP	—	30	2×10^4
Água enxague das placas após detergência alcalina (ufc/ml)	$\bar{x}$	—	nd	nd
Placas após a detergência alcalina (ufc/cm ²)	$\bar{x}$	—	nd	nd
Água enxague das placas após detergência ácida (ufc/ml)	$\bar{x}$	—	nd	nd
Placas após a detergência ácida (ufc/cm ²)	$\bar{x}$	—	nd	6
	DP	—	—	11
nd = não detectado — = não realizado DP = desvio padrão				

TABELA 6: Número de *Streptococcus thermophilus* em leite a 45°C, em placas de aço inoxidável antes e após a detergência alcalina (liquibrite, solução 1%, pH 12) e detergência ácida (dilac-U, solução 1%, pH 1,3) e sanificação com hipoclorito de sódio a 100 ppm com suas águas de enxágue (média de 5 repetições).

Etapas Testadas	médias das repetições	0 h	3 h	6 h
Leite (ufc/ml)	$\bar{x}$	5×10^2	2×10^5	8×10^7
	DP	2×10^2	1×10^5	2×10^7
Água de enxague das placas antes da detergência (ufc/ml)	$\bar{x}$	nd	4	3×10^3
	DP	—	3	2×10^3
Placas antes da detergência (ufc/cm ²)	$\bar{x}$	nd	16	2×10^4
	DP	—	8	6×10^3
Água enxague das placas após detergência alcalina (ufc/ml)	$\bar{x}$	—	—	—
Placas após a detergência alcalina (ufc/cm ²)	$\bar{x}$	—	—	—
Água enxague das placas após detergência ácida (ufc/ml)	$\bar{x}$	—	—	—
Placas após a detergência ácida (ufc/cm ²)	$\bar{x}$	—	—	—
Água enxague das placas após a sanificação (ufc/ml)	$\bar{x}$	—	nd	nd
Placas após a detergência e sanificação (ufc/cm ²)	$\bar{x}$	—	nd	nd

nd = não detectado — = não realizado DP = desvio padrão

Uma vez que o material envolvido na adesão é composto de polissacarídeos de origem ácida, um aumento da dissociação de grupos ácidos pode ter ocorrido na etapa alcalina da limpeza, pelo aumento da carga aniônica total sobre as moléculas do polímero formado durante a adesão (HANDLEY et al, 1988). Também, a maioria das superfícies de contato com solução aquosa são carregadas negativamente, assim um aumento na repulsão eletrostática de tais superfícies, pode ter provocado uma maior dispersão das bactérias do biofilme. Essa alteração de carga no meio circundante pode também ter provocado um aumento do número de cargas nas moléculas dos polímeros extracelulares, determinando mudanças na sua conformação. Para LEWIS et al (1987) com o aumento da repulsão intramolecular, a cadeia desse polímero, ao redor da célula, pode se tornar mais estendida, evitando a aproximação desta com a superfície, diminuindo portanto as influências de pequenas forças e facilitando a soltura das células.

O mesmo, porém, não ocorreu nas placas com 6 h de contato após a fase alcalina e ácida da limpeza quando ainda, embora em pequenos números, foram detectadas células viáveis do microrganismo remanescentes da adesão nessas placas de aço inoxidável (FIGURA 10). Estes resultados de adesão foram obtidos em 3 das 5 repetições realizadas, variando as contagens na fase de adesão em 6 h antes da limpeza, de $2,6$ a $6,2 \times 10^4$ células/cm², enquanto nas outras repetições foram detectadas um menor número de células aderidas (ANEXO). Estes resultados podem ter sido influenciados pelo procedimento de amostragem por zaragatoa utilizado, que, segundo FIRSTENBERG-EDEN (1981), somente remove as bactérias fracamente aderidas nas superfícies. Assim, a limpeza alcalina pode ter dispersado as estruturas e células envolvidas no biofilme, liberando parte das células fracamente aderidas, já que houve uma redução na contagem do microrganismo; e provavelmente reteve as células mais fortemente ligadas através de algum componente entre este e a superfície, removido ou solubilizado pelo detergente ácido.

Para PASSOS & KUAYE (1994) tanto o tratamento alcalino quanto o ácido não são suficientes para a completa remoção de proteínas e minerais que compoem o material incrustante em pasteurizador de leite. Portanto estes resíduos podem ter uma influência marcante no processo da adesão de microrganismos. Observações realizadas por FLETCHER & FLOODGATE (1976 citado por STONE & ZOTTOLA, 1985) também indicam a influência do cálcio no processo de adesão, já que microrganismos crescidos em ausência de cálcio podem, facilmente ser removidos de superfícies.

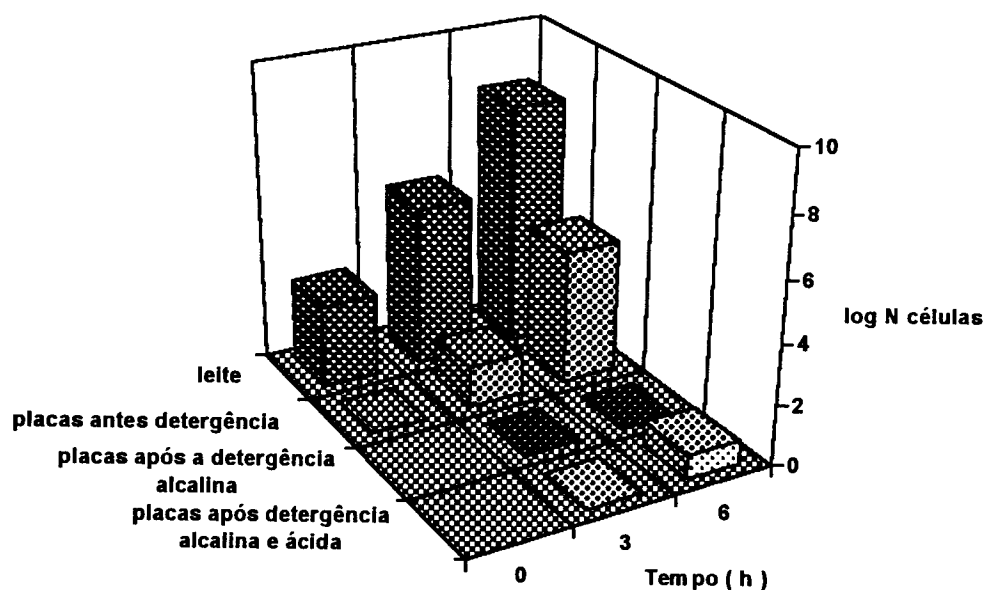


FIGURA 10: *Streptococcus thermophilus* selvagem aderidos às placas de aço inoxidável antes e após a detergência alcalina e ácida.

Os resultados deste trabalho parecem indicar que o detergente ácido, tendo uma ação mais efetiva na remoção de minerais, como o cálcio, pode ter contribuído para a liberação das células remanescentes fortemente aderidas à superfície das placas de aço inoxidável, que não foram detectadas anteriormente na fase de limpeza alcalina, aparecendo em número bastante reduzido após a limpeza ácida.

Após a limpeza alcalina e ácida uma sanificação com hipoclorito de sódio a 100 ppm de cloro ativo foi utilizada (TABELA 6). Os resultados indicaram que, nos diferentes tempos amostrados, a detergência e sanificação se mostraram suficientes para reduzir a carga de *S. thermophilus* selvagem aderidos na superfície de aço inox testada a níveis não detectados.

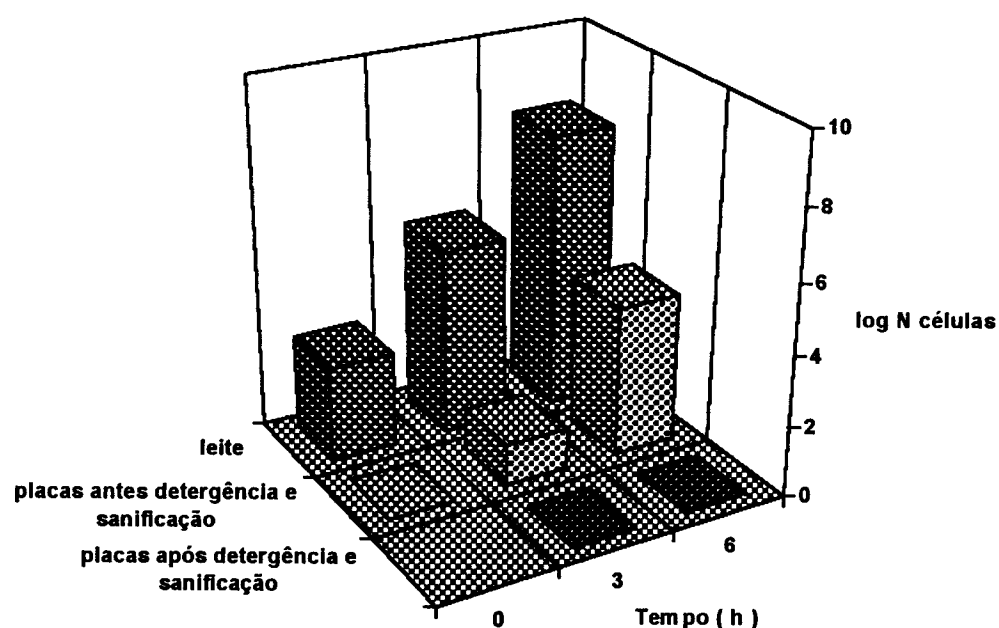


FIGURA 11: *Streptococcus thermophilus* selvagem aderidos às placas de aço inoxidável antes e após a detergência e sanitificação.

As fibras de polissacarídeos envolvidas no mecanismo de adesão, pela sua composição, dificilmente seriam afetadas pelo hipoclorito de sódio, já que este composto tem sua ação principal a nível de proteínas. O mecanismo de ação do hipoclorito de sódio nas células bacterianas não é bem conhecido, atuando, supostamente, pelo seu forte poder oxidante a nível de parede celular e possivelmente na síntese de enzimas, sendo, portanto, bastante eficiente contra microrganismos (SCHWACH & ZOTTOLA, 1984).

A sequência de etapas envolvidas na detergência, associada a sanitificação com hipoclorito de sódio a 100 ppm, avaliado neste estudo parece ter sido suficiente para reduzir muito a carga de células do *S. thermophilus* selvagem nas placas de aço inoxidável. Assim a sequência de etapas incluídas no processo de higienização, utilizando detergência alcalina e ácida seguida de sanitificação parece ser fundamental na remoção do biofilme do microrganismo aderido em superfícies (FIGURA 11).

A limpeza das placas inicialmente pelo pré-enxágüe parece remover, além da matéria orgânica, células superficiais envolvidas no biofilme, facilitando a ação do detergente alcalino. Esta detergência além de remover a maior parte do material aderido, poderia provocar uma provável dispersão das substâncias do biofilme, permitindo a ação do detergente ácido. Quantidades mínimas de células remanescentes na superfície das placas, já expostas e estressadas pela ação dos agentes de limpeza, parecem sofrer facilmente a ação oxidante do sanificante clorado. A sequência completa das etapas utilizadas no modelo experimental proposto, mostrou ter boa ação na remoção e desinfecção do *Streptococcus thermophilus* linhagem selvagem aderidos na superfície de aço inoxidável em meio com leite.

Estes resultados concordam com as observações realizadas por SCHWACH & ZOTTOLA (1982) de que um enxágüe em superfície de aço inoxidável contendo células bacterianas, antes da sanificação, não é suficiente para a remoção das células aderidas, havendo necessidade do uso da detergência com outros agentes químicos, antes dessa etapa. Essa mesma constatação foi feita por KRISYNSKI et al (1992), que obteve os melhores resultados para diferentes superfícies, quando tratamento com detergente foi associado à sanificação.

Também a metodologia e o modelo experimental utilizados em nosso experimento se mostraram adequados para a avaliação da carga de microrganismos em superfície, provavelmente, pelas repetições do teste nas mesmas condições, de maneira análoga. Estas condições são indicadas por SERRANO (1984) como sendo muitas vezes mais importantes na avaliação dos efeitos da limpeza, em uma superfície, do que o uso de metodologia eficiente na recuperação de um maior número de microrganismos.

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista as condições do nosso trabalho podemos concluir que:

5.1 - *Streptococcus thermophilus* ocorre em unidades de pasteurização de leite;

5.2 - A cultura selvagem de *Streptococcus thermophilus* isolada de leite pasteurizado por processo contínuo de pasteurização HTST é produtor de biofilme em superfície de aço inoxidável;

5.3 - O número de células em biofilme formado por esse *Streptococcus thermophilus*, em superfície de aço inoxidável, aumenta com o aumento do número de células do microrganismo no meio circundante;

5.4 - A limpeza da superfície de aço inoxidável por detergência alcalina remove mais que 99,9% das células do microrganismo aderida a essa superfície. Pequenos números de células remanescentes são também removidos na detergência ácida o que demonstra a necessidade das diferentes etapas e diferentes tipos de detergentes na eficiência da limpeza desse tipo de superfície;

5.5 - Melhores resultados na remoção das células do biofilme formado pelo *Streptococcus thermophilus* em superfícies de aço inoxidável consegue-se com a prática de detergência alcalina seguida de detergência ácida e mais eficientemente quando se utiliza uma sanificação complementar com hipoclorito de sódio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFA-LAVAL-AB **Dairy handbook**. Dairy and Food Engennering Division. PO BOX 1008 S-22103. Lund, Sweden..

ANTUNES, L.A.F. **Caracterização da flora lática de leite cru**. Campinas, 1985
113p. Tese (Doutorado). Faculdade Engenharia Alimentos e Agrícola, Unicamp.

ANWAR, H.; STRAP, J.L.; COSTERTON, W.J. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 36 (7):1347-1351, 1992.

AUCLAIR, J. Processes avoiding recontamination of pasteurized milk. **Bulletin International Dairy Federation nº 200**:15 e 16, 1986.

AUCLAIR, J. Starters in manufacture of cheese. **Bulletin International Dairy Federation nº 129**:13 e 14, 1980.

BOUMAN, S.; LUND, D.B.; DRIESSEN, F.M.; SCHMIDT, D.G. Growth of thermoresistent streptococci and deposition of milk constituint on plates of heat exchangers during long operating times. **Journal Food Protection** 45 (9): 806 - 812, 1982.

BRACQUART, P. An agar medium for the differential enumeration of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in yoghurt. **Journal Applied Bacteriology** 51(2): 303-305, 1981.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA Divisão de inspeção de leite e derivados. **Normas higiênico sanitárias e tecnológicas para leite e produtos lácteos**. Serviço de Inspeção Federal 30-Junho- 1978.

BROWN, M.R.W. & MELLING, J. Role of divalent cations in the action of polymyxin B and EDTA on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal General**

- Microbiology** **59**: 263 - 274, 1969 citado: ANWAR, H.; STRAP, J.; COSTERTON, W. - Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **36** (7):1347-1351, 1992.
- BRUM, M.A.R.; PIENIZ, L.C.; SILVA, L.H.V.; SHELABITZ, J.C. *Streptococcus* termodúricos no leite cru consumido em Santa Maria-R.S. **Revista do Centro de Ciência Rural** **7** (1):33-35, 1977.
- BURTON, H. Monograph on pasteurized milk-microbiological aspects. **Bulletin International Dairy Federation nº 200**: 9-14, 1986.
- CERNING, J.; BOUILLANNE, C.; DESMAZEAUD, M. J.; LANDON, Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. **Biotechnology Letters** **10** (4): 255 - 260, 1988.
- COSTERTON, J.W. Biofilms: an overview of what they are their significance. **Journal Food Protection** **53** (10): 901, 1990.
- COSTERTON, J.W.; GEELY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scien. Amer.** **238**: 86-95, 1978 citado: EDEN, R.F. Attachment of bacteria to meat surfaces a review. **Journal Food Protection** **44** (8): 602-607, 1981.
- COX, W.A. Characteristics and use of starter cultures in manufacture of hard pressed cheese. **Journal Society Dairy Technology** **30**: 5-15, 1977.
- CZECHOWSKI, M.H. Use of biocides to control biofilms. **Journal Food Protection** **53** (10):901, 1990.
- DAMEROW, G. The hygienic design of dairy plants and the limits to continuous processing. **Bulletin International Dairy Federation nº 279**: 38 - 44, 1993.

- DAVIS, F.L. & LAW, B.A. **Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Elsevier Applied Science Publishers. London, New York, 1984, 260p.
- DRIESSEN, F.M.; VRIES, J; KINGMA, F. Adhesion and growth of thermoresistent streptococci on stainless steel during heat treatment of milk. **Journal Food Protection** 47(11): 848-852, 1984.
- DUNSMORE, D.G. & BATES, P.J. Attachment of bacteria to glass surfaces immersed in milk. **Australian Journal Dairy Technology**, march:35 e 36, 1982.
- EDEN, R.F. Attachment of bacteria to meat surfaces a review. **Journal Food Protection** 44(8): 602-607, 1981.
- FARBER, J.M.& IDZIAK, E.S. Attachment of psychrotrophic meat spoilage bacteria to muscle surfaces. **Journal Food Protection** 47 (2):92-95,1984.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. Attachment of bacteria to meat surfaces: a review. **Journal Food Protection** 44(8): 602-607, 1981.
- FLETCHER, M. The question of passive versus active attachment mechanisms in non specific bacterial adhesion pp197-210. In: BERKELEY, R.C.W.; LYNCA, J.M.; MELLING, J.; RUTTER, P.R.; VINCENT, B. **Microbial adhesion to surfaces**. Society of Chemical Industry, Ellis Horwood Limited, Chichester, England , 1980 citado: HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. Scanning eletron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal Food Protection** 51(6): 445-448, 1988b.
- FLETCHER, M & FLOODGATE, G.D. Eletron microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. **Journal General Microbiology** 74: 325- 334, 1973 citado: SCHWACH, T. S. & ZOTTOLA, E. A. Use of scanning eletron microscopy to demonstrate microbial attachment to beef and beef contact surfaces. **Journal Food Science** 47: 1401 - 1405, 1982.

- FLETCHER, M & FLOODGATE, G.D. The adhesion of bacteria to solid surfaces. In: *Microbial Ultrastructure*. Ed. R.Fuller & D.Lovelock, Academic Press, London, 1976, 101p citado por STONE, L.S. & ZOTTOLA, E.A. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. *Journal Food Science* 50(4): 951- 956,1985.
- FLETCHER, M. & LOEB, G.I. Influence of substratum chracteristics on attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Applied and Enviromental Microbiology* 37: 67-72, 1979.
- FOSTER, E. M.; NELSON, F. E.; SPECK, M.L.; DOETSCH, R. N.; OLSON, J.C. *Dairy microbiology*. Englewood Cliffs, New Jersey, Printice Hall, 1957, 492p.
- FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physies and microbiology**. volume I - general aspects. Elsevier Applied Science, London, New York, 1987, 400p.
- FRANK, J.F. & KOFFI, R. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* in associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal Protection* 53(7): 550-554, 1990.
- GARCIA, S. **Isolamento e seleção de culturas lácticas para fabricação de queijos**. Campinas, 1984. 89p. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Unicamp.
- GERALDINI, A.M.; DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; OLIVEIRA, C.M.M.; UBOLDI EIROA, M.N. Caracterização de bactérias lácticas em alimentos. 1- caracterização de meios sólidos para contagens de culturas puras. *Boletim Instituto de Tecnologia de Alimentos* 16(1):53-64, 1979.
- GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; COSTILOW, R.N.; NESTER, E.W.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R.; PHILLIPS, G.B. **Manual of Methods for General Bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington 1981, 524p.
- GILLILAND, S.E. **Bacterial starter cultures for foods**. CRC Press Inc, Florida USA, 1985, 205p.

- GIRRAFA, G.; NEVIANI, E.; CARMINATI, D. Acidifying activity of *S. thermophilus* under a thermal cycle process. **Michwissenschaft** 48(3): 128-130, 1993.
- GUTHRIE, R.K. **Food sanitation**. 3^a ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 1988, 330p.
- HANDLEY, P.S.; HARGRAVES, J.; HARTY, D.W.S. Ruthenium red staining reveals surface fibrils and a layer external to the cell wall in streptococcus salivarius HB and adhesion deficient mutants. **Journal General Microbiology** 134: 3165- 3172, 1988.
- HANSEN, N. H. & RIEMANN, H. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. **Journal Applied Bacteriology** 26(3): 314 - 333, 1963.
- HARRIGAN, M. F. & MC CANCE, M.E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. London, Academic Press, 1978, 452p.
- HAYES, P.R. **Food microbiology and higyene**. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 1985, 403p.
- HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. **Journal Food Science** 53 (5): 1549-1552 e 1562, 1988a.
- HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. Scanning eletron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal Food Protection** 51(6): 445-448, 1988b.
- HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. The use of transmission eletron microscopy to study the composition of *Pseudomonas fragi* attachment material. **Food Microstructure** 7: 53 - 57, 1988c.

HITCHERNER, B.J.; EGAN, A.F.; ROGERS, P.J. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. **Journal Applied Bacteriology** 52(1):31-37,1982.

HOBBS, B. & GILBERT, R. J. **Higiene y toxicologia de los alimentos**. 2ª ed. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha, 1986, 441p.

HOYLE, B.D.; JASS, J.; COSTERTON, J.W. The biofilm glycocalix as a resistance factor. **Journal Antimicrobial Chemotherapy** 26(1): 1-6, 1990 citado por WIRTANEN, G. & SANDHOLM, T.M. Removal of foodborne biofilms comparison of surface and suspension test. Part I. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 25(1): 43-49,1992b.

HUP, G.; BANGMA, A.; STADHOUDERS, J. Groei van thermoresistente streptococci in kaasmelkpasteurs. 1- Enkele waarnemingen in kaasbedrijven **Voedingsmiddelentechnologie** 12(20): 67 - 69, 1979.

HUP, G. & STADHOUDERS, J. Groei van thermoresistente streptococci in kaasmelkpasteurs. 3- De specifieke flora en de invloed op de kaas. **Voedingsmiddelentechnologie** 12(24): 29 - 32, 1979.

HUTKINS, R.W. & MORRIS, H.A. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal Food Protection** 50 (10): 876 - 884, 1987.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS **Microbiological ecology of foods** . volume 1, Academic Press Inc. New York, 1980, 332p.

JORDANO, R.; SERRANO, C.E.; TORRES, M.; SALMERON, J. Comparison of three M17 media for the enumeration of *S. thermophilus* in fermented dairy products. **Journal Food Protection** 55(12): 999- 1000, 1992.

KING, N.S. & KOBURGER, J.A. Characterization of some group N streptococci. **Journal Dairy Science** 53:403-409, 1970.

- KLAENHAMMER, T. R. & KLEEMAN, E. G. Growth characteristics, bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology** 41(6): 1461-1467, 1981.
- 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** 55(4):246-251, 1992.
- LEE, S.H. & FRANK, J.F. Inactivation of surface adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. **Journal Food Protection** 54(1):4-6, 1991.
- LEITÃO, M.F.F.; TEIXEIRA, L.T.; MORI, E.E.M. Bactérias termofílicas não esporogênicas e seu significado na qualidade do leite comercial pasteurizado. **Coletâneas do Instituto de Tecnologia de Alimentos** 17(1): 54-64, 1987.
- LEWIS, S. J.; GILMOUR, A.; FRASER, T. W.; MCCALL, R.D. Scanning electron microscopy of soiled stainless steel inoculated with single bacterial cells. **International Journal Food Microbiology** 4: 279 - 284, 1987.
- LEWIS, S. J.; GILMOUR, A.; JOHNSTON, D.E. Factors influencing the detachment of a polymer-associated *Acinetobacter sp* from stainless steel. **International Journal Food Microbiology** 8 (2):155-164, 1989.
- MACHADO, E.S.V. **Flora dominante do leite cru e pasteurizado**. Campinas, 1975. 36p. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Unicamp.
- MAFU, A.A.; ROY, D.; GOULET, J; SAVOIE, L.; ROY, R. Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces. **Journal Dairy Science** 73(12): 3428-3432, 1990.
- MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.N.; MCCURDY, A.R. Thermal resistance of streptococci isolated from pasteurized ham. **Canadian Institute Food Science Technology Journal** 19(2): 62 - 67, 1986.

- MAHARI, T.& GASHE, B. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the sources of contamination in a milk processing plant in Addis Ababa - Ethiopia. **Journal Dairy Research** 57(9): 233-238, 1990.
- MARRIOT, N.G. **Principles of food sanitation** . 2^a ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 1989, 387p.
- MARSHALL, V.M. Fermented milks and their future trends. I- microbiological aspects. **Journal Dairy Research** 54: 559 - 574, 1987.
- MARSHALL, K.C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology** 68: 337-348, 1971.
- MARTH, E.H. Certain aspects of starter culture metabolism. In: Symposium on lactic starter cultures. **Journal Dairy Science** 45: 1271 - 1281, 1962.
- MATTILA, T.; MANIEN, M.; KYLÄSIUROLA, A.L. Effect of cleaning in place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. **Journal Dairy Research** 57 (2): 33-39, 1990.
- MAXCY, R.B. Nature and growth response of the microflora of pasteurized, packaged milk. **Journal of Milk and Food Technology** 30(7): 213-218, 1967.
- McSWEEGAN, E. & WALKER, R.I. Identification and characterization of to *Campylobacter jejuni* adhesions for celular and mucous substracte. **Infecti. Immun.** 53: 141-148, 1986 citado: HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. Scanning eletron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal Food Protection** 51(6): 445-448, 1988b.
- MEADOWS, P.S. The attachment of bacteria to solid surfaces. **Archieve Mikrobiological** 75:374-381, 1971.
- MOTTAR, J. & WAES, G. Quality control of pasteurized milk. **Bulletin International Dairy Federation nº 200**: 66 - 70, 1986.

- NIEMIERSKI, P.; FEIER, U.; GROSSKLAUS, D. The influence of time and temperature on the pasteurization effects of short-time heating of milk. **Milchwissenschaft** 37(3):133-138,1982.
- NOTERMANS, S.; EDEN, R.F.; SCHOTHRST, M.V. Attachment of bacteria to teats of cows. **Journal Food Protection**, 42 (3): 228-232,1979.
- OLIVEIRA, J.S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. Campinas, Editora. Ícone, 1986, 146p.
- OLSON, N. Contamination cheese-how bacteria can survive in the H.T.S.T. pasteurizer. **Dairy Record**, july: 66-68, 1983.
- ONGGO, I & FLEET, G.H. Media for the isolation and enumeration of lactic acid bacteria from yoghurt. **Australian Journal Dairy Technology** 48(2):89-92, 1993.
- PASSOS, M.H.C.R. & KUAYE, A.Y. Limpeza de depósitos incrustantes de pasteurizador de leite por detergentes alcalinos e ácidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 14(1):105-112, 1994.
- RADKE-MITCHELL, L.C. & SANDINE, W.E. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal Dairy Science** 69(10):2558-2568, 1986.
- RASIC, J.L.& KURMANN, J.A. **Yoghurt- scientific grounds, technology, manufacture and preparations**. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, 1978, 428p.
- RICHARDSON, G.N. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15ª ed American Public Health Association, Washington, D.C., 1985, 412p.
- ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactologica**. volume 1- microbiologia de la leche. Editora Acribia, Zaragoza, 1987, 230p.

SCHWACH, T. S. & ZOTTOLA, E. A. Use of scanning eletron microscopy to demonstrate microbial attachment to beef and beef contact surfaces. **Journal Food Science** 47: 1401 - 1405, 1982.

SCHWACH, T.S. & ZOTTOLA, E.A. Scanning eletron microscopic study on some effects of sodium hypochlorite on attachment of bacteria to stainless steel. **Journal Food Protection** 47(10):756-759, 1984.

SERRANO, A. M. Métodos de amostragem para a avaliação da limpeza e sanificação. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes** 39(235): 13-15, 1984.

SHERMAN, J.M. The streptococci. **Bacteriological Review** 1: 3 - 97, 1937.

SINHA, R.P. Effect of carbohydrate on the viability of *Streptococcus thermophilus*. **Journal Food Protection** 54(7): 537-541, 1991a.

SINHA, R.P. Effect of carbohydrate concentrations of thermal stability of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* in M17 medium. **Journal Dairy Science** 74 (supplement 1):123,1991b.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Volume 2. Willians & Wilkins, Baltimore, USA, 1986, 948 -1599p.

SPECK, M.L. **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 2ª ed. American Plublic Health Association, Washington, D.C., 1984, 914p.

SPEERS, J.G.S. & GILMOUR, A. A influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. **Journal Applied Bacteriology** 59(4):325-332, 1985.

- SPINNLER, H.E.; BOUILLAINNE, C.; DESMAUZEAUD, M.J.; CORRIEU, G. Measurement of the partial pressure of dissolved CO₂ for estimating the concentration of *Streptococcus thermophilus* in coculture with *Lactobacillus bulgaricus*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 25(5): 464-470, 1987.
- STAAL, P. F. J. Legislation-statutory regulations applicable to pasteurized fluid milk in a selected number of countries. **Bulletin International Dairy Federation** nº200:71 - 79, 1986.
- STANLEY, P.M. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. **Canadian Journal Microbiology** 29: 1493-1499, 1983 citado: HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal Food Protection** 51(6): 445-448, 1988b.
- STONE, L.S. & ZOTTOLA, E.A. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. **Journal Food Science** 50(4): 951-956, 1985.
- STUMBO, C.R. Thermal resistance of bacteria. In: **Thermobacteriology in food processing**. 2ª ed. M.L. Anson, Academic Press, London, 1973, 329p.
- TAMIME, A.Y. & DEETH, H.C. Yoghurt: technology and biochemistry. **Journal Food Protection** 43(12): 939 - 977, 1980.
- TERZAGHI, B.E. & SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied Microbiology** 29(6):807-813, 1975.
- THOMAS, S.B.; DRUCE, R.G.; PETERS, G.J.; GRIFFITHS, D.G. Incidence and significance of thermophilic bacteria in farm milk supplies: a reappraisal and review. **Journal Applied Bacteriology** 30(2): 265-298, 1967.
- TINSON, W.; HILLIER, A.J.; JAGO, G.R. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. 1- Utilization of lactose, glucose and galactose. **Australian Journal Dairy Technology** 37(1):8-13, 1982a.

- TINSON, W.; BROOME, M.C.; HILLIER, A.J.; JAGO, G.R. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. 2- Production of CO₂ and NH₃ from urea. **Australian Journal Dairy Technology** 37(1):14-16, 1982b.
- VANDENBERG, M. G. Pasteurization of milk - design and operation. **Bulletin International Dairy Federation** nº 200:35 - 51, 1986.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, F.D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3^a ed , American Public Health Association, Washington, D.C.,1992,1219p.
- VIEIRA, S.D.A. A utilização de culturas lácticas na indústria de laticínios. **Revista Instituto Laticínios "Candido Tostes"** 215:29-36, 1981.
- WIRTANEN, G. & SANDHOLM, T.M. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 25(1):50-54,1992a.
- WIRTANEN, G. & SANDHOLM, T.M. Removal of foodborne biofilms comparison of surface and suspension test. Part I. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 25(1): 43-49,1992b.
- ZOLTAI, P.T.; ZOTTOLA, E.A.; MCKAY, L.L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. **Journal Food Protection** 44(3): 204 - 208, 1981.
- ZOTTOLA, E.A. Development of biofilms in food processing environments. **Journal Food Protection** 53(10): 901, 1990.

7 - ANEXO

Números de *Streptococcus thermophilus* selvagem em leite a 45°C, em placas de aço inoxidável antes e após a detergentia alcalina (solução 1%, pH12) e ácida (solução 1%, pH 1,3) com seus respectivos enxagues obtidos nas repetições do experimento indicado na TABELA 5 (nd = não detectada; – = não realizado).

Etapas Testadas	repetições	0 h	3 h	6 h
Leite (ufc/ml)	1	6,8x10 ²	1,2x10 ⁵	1,2x10 ⁸
	2	5,2x10 ²	1,8x10 ⁵	1,0x10 ⁷
	3	6,2x10 ²	9,7x10 ⁴	1,4x10 ⁸
	4	3,5x10 ²	4,7x10 ⁵	2,4x10 ⁸
	5	7,7x10 ²	1,8x10 ⁵	1,1x10 ⁸
Água de enxague das placas (ufc/ml)	1	nd	2,0est	1,3x10 ³
	2	nd	1,0est	2,2x10 ³
	3	nd	1,0est	8,0x10 ³
	4	nd	2,3x10	3,0x10 ³
	5	nd	6,0est	1,3x10 ³
Placas antes da detergentia (ufc/cm ²)	1	nd	1,3x10	3,4x10 ⁴
	2	nd	4,6	8,8x10 ³
	3	nd	1,3x10	2,6x10 ⁴
	4	nd	7,7x10	6,2x10 ⁴
	5	nd	7,7	1,7x10 ⁴
Enxágüe após detergentia alcalina (ufc/ml)	1	–	nd	nd
	2	–	nd	nd
	3	–	nd	nd
	4	–	nd	nd
	5	–	nd	nd
Placas após detergentia alcalina (ufc/ml)	1	–	nd	nd
	2	–	nd	nd
	3	–	nd	nd
	4	–	nd	nd
	5	–	nd	nd

continua

continuação

Etapas Testadas	repetições	0 h	3 h	6 h
Água de enxague	1	—	nd	nd
após detergência	2	—	nd	nd
ácida	3	—	nd	nd
(ufc/ml)	4	—	nd	nd
	5	—	nd	nd
Placas após	1	—	nd	2,8x10
detergência ácida	2	—	nd	nd
(ufc/cm ²)	3	—	nd	0,2
	4	—	nd	2,4
	5	—	nd	nd

Números de *Streptococcus thermophilus* selvagem em leite, em placas de aço inoxidável antes e após a detergência alcalina (solução 1%, pH12), ácida (solução 1%, pH 1,3) e sanificação com hipoclorito de sódio 100 ppm com seus respectivos enxágües obtidos nas repetições do experimento apresentado na TABELA 6 (nd = não detectado ;

– = não realizado ; ? = dado perdido)

Etapas Testadas	repeti- ções	0 h	3 h	6 h
Leite (ufc/ml)	1	5,9x10 ²	1,6x10 ⁵	1,0x10 ⁸
	2	5,1x10 ²	4,2x10 ⁵	7,1x10 ⁷
	3	5,5x10 ²	1,7x10 ⁵	9,6x10 ⁷
	4	7,1x10 ²	1,9x10 ⁵	7,8x10 ⁷
	5	2,4x10 ²	3,5x10 ⁴	3,5x10 ⁷
Água de enxague das placas (ufc/ml)	1	nd	7,5est	1,6x10 ³
	2	nd	5,0est	3,9x10 ³
	3	nd	2,0est	7,0x10 ³
	4	nd	7,0est	2,9x10 ²
	5	nd	nd	3,6x10 ³
Placas antes da detergência (ufc/cm ²)	1	nd	1,8x10	2,4x10 ⁴
	2	nd	2,8x10	2,0x10 ⁴
	3	nd	1,0x10	2,1x10 ⁴
	4	nd	1,9x10	2,3x10 ⁴
	5	nd	4,1	7,8x10 ³
Água de enxague das placas após detergência e sanificação (ufc/ml)	1	–	nd	nd
	2	–	nd	nd
	3	–	nd	nd
	4	–	nd	?
	5	–	nd	nd
Placas após detergência e sanificação (ufc/cm ²)	1	–	nd	nd
	2	–	nd	nd
	3	–	nd	nd
	4	–	nd	nd
	5	–	nd	nd